

GOETHE-UNIVERSITÄT FRANKFURT AM MAIN

**Intramolekulares Interaktionsinterface
des MLL Proteins als therapeutisches Target
der Translokation t(4;11)**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Clarissa Oehm
aus Koblenz

Frankfurt am Main, 2009
(D30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der
Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Dieter Steinhilber

1. Gutachter: Prof. Dr. R. Marschalek

2. Gutachter: Prof. Dr. T. Dingermann

Datum der Disputation: 30. März 2009

Für meine Familie

Probleme kann man niemals mit derselben Denkweise lösen, mit der sie entstanden sind

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	VI
1 Zusammenfassung.....	1
2 Einleitung	3
2.1 Leukämie.....	3
2.2 Chromosomale Translokationen als Ursache für Leukämien	4
2.3 Ursachen chromosomaler Translokationen.....	5
2.4 Aberrationen des <i>MLL</i> Gens und assoziierte Leukämien	7
2.5 Die Translokation t(4;11)	11
2.5.1 Klinische Charakteristika einer t(4;11).....	12
2.5.2 Die beteiligten Gene <i>MLL</i> und <i>AF4</i>	13
2.5.3 Aufbau der Wildtyp Proteine <i>MLL</i> und <i>AF4</i>	17
2.5.4 Funktionen der Wildtyp Proteine <i>MLL</i> und <i>AF4</i>	25
2.5.5 Aufbau und Funktion der Fusionsproteine und ihre Rolle bei der Leukämogenese	29
2.5.6 Intramolekulare Proteininteraktion des <i>MLL</i> Proteins	34
2.6 Zielsetzung der Arbeit.....	36
3 Ergebnisse	38
3.1 Vereinigung der publizierten Interaktionsdomänen	38
3.1.1 Bakteriellcs Zweihybrid-System	38
3.2 Minimierung der Interaktionsdomänen.....	44
3.2.1 Zellbasiertes Zweihybrid Protein-Translokation-Biosensor (PTB)- System	44
3.2.2 Theoretisches Design verkürzter Fragmente für die Interaktionsanalyse	50
3.3 Auffälligkeiten während der Interaktionsstudien - Folgeversuche.....	67

3.3.1	Interaktionsanalyse des Fragments FYRC_B3 mit den full length Proteinen MLL sowie AF4/MLL	68
3.3.2	Auswirkungen verschiedener MLL Fragmente auf die Konstitution von Zellen	78
3.3.3	Letalitätstest von FYRC_B3 in verschiedenen Vektor-Systemen	81
3.3.4	Effekt der FYRC-Fragmente: Durchflusscytometrische Analyse von HeLa und SEM Zellen.....	84
3.4	Modell zur Entstehung letaler Effekte durch Expression kurzer MLL Fragmente	91
4	Diskussion	93
4.1	Identifikation der minimalen Proteininteraktionsdomänen des MLL Proteins.....	94
4.2	Interaktion des FYRC_B3 Fragments mit den <i>full length</i> Proteinen MLL und der4	97
4.3	Die Expression verschiedener MLL Fragmente hat ein Absterben der Zellen zur Folge	101
4.4	Diskussion des Modell zur Entstehung letaler Effekte durch Expression verschiedener MLL Proteinfragmente	104
5	Material und Methoden	105
5.1	Materialien	105
5.1.1	Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Geräte und ihre Bezugsquellen	105
5.1.2	Puffer und Lösungen.....	110
5.1.3	Verwendete Organismen	111
5.1.4	Synthetische Oligonukleotide.....	112
5.1.5	Verwendete Plasmide	115
5.2	Molekularbiologische Methoden	117
5.2.1	Standardmethoden	117
5.2.2	Sequenz-Analysen.....	118
5.2.3	Annealing zweier Oligonukleotide	118
5.3	Bakterielles-2-Hybrid-System	119
5.3.1	Klonierung und Verifikation der bakteriellen Plasmide.....	121

5.3.2	Co-Transformation und Interaktionsanalyse.....	121
5.4	Arbeiten mit Säugerzellen.....	122
5.4.1	Transfektion von adhärenen Säugerzellen mittels Lipofectamin.....	122
5.4.2	Transfektion von adhärenen Säugerzellen mittels Polyethylenimin (PEI)	123
5.4.3	Transfektion von Suspensionszellen durch Nukleofektion.....	123
5.4.4	Herstellung von Gesamt-Zelllysate aus adhärenen Zellen	124
5.4.5	Co-Immunopräzipitation	124
5.4.6	Durchflusscytometrie zur Bestimmung der GFP ⁺ und PI ⁺ Zellen	125
5.4.7	Propidiumiodid Färbung.....	126
5.4.8	Herstellung von Dauerpräparaten	126
6	Abkürzungsverzeichnis.....	128
7	Literaturverzeichnis	133
8	Anhang.....	147
8.1	Lebenslauf.....	147
8.2	Publikationen und Vorträge	148
8.3	Danksagung	149

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 2-1:	Zellulärer Tropismus der 3 häufigen Fusionen <i>MLL–AF4</i> , <i>MLL–AF9</i> und <i>MLL–ENL</i>	8
Abbildung 2-2:	Verteilung und Häufigkeit der Translokationspartner bei <i>de novo</i> und Therapie-induzierten <i>MLL</i> Translokationen	9
Abbildung 2-3:	Modularer Aufbau des <i>MLL</i> Proteins	17
Abbildung 2-4:	Prozessierung des nativen <i>MLL</i> Proteins	21
Abbildung 2-5:	Aufbau des <i>AF4</i> Proteins	24
Abbildung 2-6:	Aufbau der Fusionsproteine einer t(4;11)	31
Abbildung 2-7:	Pathologischer Mechanismus des der4 Fusionsproteins	33
Abbildung 2-8:	Darstellung der publizierten Interaktionsdomänen des <i>MLL</i> Proteins	35
Abbildung 3-1:	Schematische Darstellung des bakteriellen Zweihybrid-System	39
Abbildung 3-2:	Darstellung der zu testenden Proteinfragmente im B2H-System	40
Abbildung 3-3:	Schematische Darstellung des <i>NdeI-SfiI</i> -Linkers	42
Abbildung 3-4:	Restriktionsverdau der klonierten Plasmide für das B2H-System.	42
Abbildung 3-5:	Untersuchung des bakteriellen Wachstums auf Selektionsplatten des B2H-Systems	43
Abbildung 3-6:	Zellbasiertes Zweihybrid Protein-Translokation-Biosensor-System	46
Abbildung 3-7:	Restriktionsverdau der klonierten Plasmide für das PTB-System (I)	47
Abbildung 3-8:	Mikroskopische Analyse des Interaktionstest der <i>MLL</i> Domänen FYRC und FYRN03 in HeLa Zellen	48
Abbildung 3-9:	Mikroskopische Analyse des Interaktionstest der <i>MLL</i> Domänen FYRC/SET und FYRN03 in HeLa Zellen	49
Abbildung 3-10:	Hypothetische Interaktionsstruktur des <i>MLL</i> Proteins	51
Abbildung 3-11:	Restriktionsverdau der klonierten Plasmide für das PTB-System (II)	52
Abbildung 3-12:	Mikroskopische Analyse des Interaktionstest der <i>MLL</i> Domänen FYRCshort und FYRN in HeLa Zellen	53
Abbildung 3-13:	Darstellung der nachgewiesenen Interaktionsdomänen.	53
Abbildung 3-14:	Restriktionsverdau der klonierten Plasmide für das PTB-System (III)	54
Abbildung 3-15:	Mikroskopische Analyse der Kontroll-Transfektionen der N-terminalen <i>MLL</i> Fragmente FYRN_A1, FYRN_A2, FYRN_A3 und FYRN_A6 mit dem Leervektor p3-NLS-GFP/GST-NES in HeLa Zellen	56
Abbildung 3-16:	Mikroskopische Analyse der Kontroll-Transfektionen der C-terminalen <i>MLL</i> Fragmente FYRC_B1, FYRC_B2, FYRC_B3 und FYRC_B6 mit dem Leervektor pc3-RevM10BL-BFP in HeLa Zellen	57
Abbildung 3-17:	Mikroskopische Analyse des Interaktionstest der <i>MLL</i> Fragmente FYRC_B1, FYRC_B2, FYRC_B3 bzw. FYRC_B6 mit FYRN_A1, FYRN_A2, FYRN_A3 bzw. FYRN_A6 in HeLa Zellen	58
Abbildung 3-18:	Schematische Darstellung der <i>MLL</i> Fragmente FYRN_A3 und FYRC_B3	60
Abbildung 3-19:	Restriktionsverdau der klonierten Plasmide für das PTB-System (IV)	61

Abbildung 3-20:	Mikroskopische Analyse der Kontroll-Transfektionen der MLL Fragmente FYRN_A4, FYRN_A5, FYRC_B4 sowie FYRC_B5 mit dem Vektor pc3-RevM10BL-BFP.....	62
Abbildung 3-21:	Mikroskopische Analyse der Interaktionstests der MLL Fragmente FYRC_B3, FYRC_B4, FYRC_B5 mit FYRN_A3, FYRN_A4 und FYRN_A5 in HeLa Zellen	65
Abbildung 3-22:	Ergebnis der Interaktionsanalyse. Minimales Interaktionsinterface des MLL Proteins	67
Abbildung 3-23:	Schematische Darstellung des <i>Sfi</i> I-Linkers.	69
Abbildung 3-24:	Restriktionsverdau des Vektors pTARGET Δ Sfi-MLL.	69
Abbildung 3-25:	Immunoblotanalysen der Co-Immunopräzipitationsversuche	71
Abbildung 3-26:	Schematische Darstellung der doppelt-farbmarkierten Proteine MLL und AF4/MLL (der4)	72
Abbildung 3-27:	Restriktionsverdau der klonierten Plasmide für die Fluoreszenz-mikroskopische Interaktionsanalyse.....	73
Abbildung 3-28:	Mikroskopische Analyse transfizierter HeLa Zellen zur Detektion von mCherry-MLL-BFP und mCherry-der4-BFP.....	75
Abbildung 3-29:	Mikroskopische Analyse von HeLa Zellen nach Co-Transfektion von FYRC_B3 mit den <i>full length</i> Proteinen MLL und der4.....	78
Abbildung 3-30:	Mikroskopische Analyse transfizierter Zellen zur Veranschaulichung der Einteilung in tote und lebende Zellen anhand der Morphologie	79
Abbildung 3-31:	Anzahl toter HeLa Zellen infolge der Expression verschiedener MLL Fragmente.....	80
Abbildung 3-32:	Restriktionsverdau der klonierten Plasmide für Aktivitätsanalysen des FYRC_B3 Fragments	82
Abbildung 3-33:	Anzahl toter HeLa Zellen infolge der Expression des FYRC_B3 Fragments in verschiedenen Vektoren	83
Abbildung 3-34:	Anzahl toter HeLa Zellen in den GFP ⁺ Zellpopulationen infolge der Expression der C-terminalen MLL Fragmente.....	85
Abbildung 3-35:	Vergleichende Darstellung der Anzahl toter GFP ⁺ HeLa Zellen im Verhältnis zu der Anzahl aller toten Zellen in einer Probe zum Zeitpunkt t = 24h.	86
Abbildung 3-36:	Anzahl toter HeLa Zellen der GFP ⁺ Populationen im Vergleich zu den GFP ⁻ Populationen nach Transfektion der C-terminalen MLL Fragmente zum Zeitpunkt t = 48h.....	87
Abbildung 3-37:	Anzahl toter SEM Zellen in den GFP ⁺ Zellpopulationen infolge der Expression der C-terminalen MLL Fragmente	89
Abbildung 3-38:	Vergleichende Darstellung der Anzahl toter GFP ⁺ SEM Zellen infolge der Expression der C-terminalen MLL Fragmente zum Zeitpunkt t = 48h in 3 durchgeführten Versuchen	90
Abbildung 3-39:	Möglicher Mechanismus der Entfaltung letaler Effekte bei Expression von verschiedenen C-terminalen MLL Fragmenten in HeLa Zellen sowie in t(4;11)-positiven SEM Zellen.....	92

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2-1:	Klassifizierung von Leukämien	3
Tabelle 3-1:	Ergebnisse der Interaktionsanalyse im B2H-System	44
Tabelle 3-2:	Häufigkeit der Aminosäuren F, Y, D, E, R und K	50
Tabelle 3-3:	Ergebnisse der Interaktionsanalysen der verschiedenen MLL Fragmente	59
Tabelle 3-4:	Ergebnisse aller Interaktionsanalyse	66

1 ZUSAMMENFASSUNG

Chromosomale Aberrationen des humanen *MLL* Gens (*Mixed Lineage Leukemia*) sind mit der Entstehung von akuten Leukämien assoziiert. 5-10% aller akuten myeloischen und lymphatischen Leukämien beruhen auf einer Translokation des *MLL* Gens mit einem von mehr als 50 bekannten Partnergenen. Die reziproke Translokation t(4;11), die zur Entstehung der zwei Fusionsgene *MLL/AF4* und *AF4/MLL* führt, stellt die häufigste genetische Veränderung des *MLL* Gens dar und prägt sich in Form einer akuten lymphatischen Leukämie aus. Besonders häufig sind von dieser Erkrankung Kleinkinder und Patienten mit einer Sekundärleukämie betroffen. Aufgrund einer ungewöhnlich hohen Resistenz der leukämischen Blasten gegenüber gängigen Therapie-Protokollen, ist diese Erkrankung mit einer extrem schlechten Prognose verbunden.

Bei der Translokation t(4;11) verfügen beide Fusionsgene, die in Folge der Translokation entstehen, über einen intakten Leserahmen und führen dementsprechend zur Expression der zwei Fusionsproteine *MLL/AF4* (der11) und *AF4/MLL* (der4). Transduktionsexperimente verschiedener *MLL* Translokationen zeigten, dass in vielen Fällen das jeweilige der11 Fusionsprotein (*MLL_N*/Translokationspartner) starkes onkogenes Potential besitzt und daher vermutlich ursächlich für die Transformation der betroffenen Zellen ist. Im Fall der Translokation t(4;11) hingegen, konnte für das der11 Fusionsprotein *MLL/AF4* nur sehr schwaches onkogenes Potential nachgewiesen werden, während das der4 *AF4/MLL* Fusionsprotein sich als potentes Onkoprotein herausstellte.

Untersuchungen zur Aufklärung des pathologischen Mechanismus des *AF4/MLL* Fusionsproteins zeigten, dass es, analog zum *MLL* Wildtyp Protein, einer Prozessierung durch die Taspase 1 unterliegt. Desweiteren ist bekannt, dass die gebildeten Proteinfragmente, der4_N und der4_C (*MLL_C*), über intramolekulare Interaktionsdomänen des *MLL* Proteins, in der Lage sind miteinander zu komplexieren. In der unprozessierten Form wird das Fusionsprotein über einen Bereich des *AF4* Proteins unter Einsatz der E3-Ligasen SIAH 1/2 dem proteasomalen Abbau zugeführt. Nach der Proteolyse und Komplexbildung findet weiterhin eine Erkennung durch die SIAH Proteine statt, jedoch erfolgt keine Degradation mehr. Auf diese Weise kommt es zur Akkumulation des Komplexes, was letztendlich zur Transformation der betroffenen Zellen führt.

Eine Möglichkeit dem onkogenen Charakter des *AF4/MLL* Fusionsproteins entgegen zu wirken, besteht in der Inhibition der Interaktion der zwei Proteinfragmente der4_N und der4_C (= *MLL_C*).

Für eine mögliche Inhibition stellt die Kenntnis der minimalen Kontaktdomäne des MLL Proteins (und damit gleichermaßen des AF4/MLL Proteins) eine Grundvoraussetzung dar. Die grundlegende Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand daher in der Bestimmung des minimalen intramolekularen Interaktionsinterface. Zu diesem Zweck wurden Interaktionsanalysen verschiedener C-terminaler und N-terminaler MLL Proteinfragmente unter Verwendung des bakteriellen Zwei-Hybrid-Systems sowie eines zellbasierten Protein-Translokation-Biosensor-Systems durchgeführt. Dabei ist es gelungen, die Größe der minimalen Interaktionsdomänen von den bis heute publizierten >150 Aminosäuren auf 58 Aminosäuren im N-terminalen MLL Proteinfragment (FYRN_A3) bzw. 56 Aminosäuren im C-terminalen MLL Proteinfragment (FYRC_B3) einzugrenzen. Eine weitere Verkleinerung führte zu einem Stabilitätsverlust der Interaktion.

Eine ungewöhnliche Akkumulation einiger C-terminaler MLL Fragmente, die während der Interaktionsstudien beobachtet wurde, führte zu der Hypothese, dass die generierten Fragmente mit dem zellulären Wildtyp MLL interagieren und möglicherweise als Inhibitor der intramolekularen Interaktion agieren können. Zusätzlich wurde bei diesen Transfektionen eine abnorm hohe Anzahl abgestorbener Zellen festgestellt. Dies wäre damit zu erklären, dass das zelluläre MLL, durch Interaktion mit dem kleinen MLL Fragment, nicht mehr in der Lage ist, seinen natürlichen Funktionen nachzukommen.

Der Nachweis der Interaktion des minimierten C-terminalen MLL Proteinfragments FYRC_B3 mit den *full length* Proteinen MLL sowie AF4/MLL konnte über Co-Immunopräzipitationsversuche erbracht werden.

Durchflusscytometrische Analysen transfizierter und Propidiumiodid gefärbter HeLa Zellen sowie t(4;11)-positiver SEM Zellen zeigten eindeutig letale Effekte einiger FYRC-Fragmente auf. 48h nach Transfektion des FYRC_B3 Fragments in HeLa Zellen, waren bis zu 80% der Zellen abgestorben. SEM Zellen, welche typischerweise äußerst Resistenz gegenüber äußeren Einflüssen sind, zeigten bei Expression des FYRC_B1 Fragments nach 48h einen Anteil von >70% toter Zellen.

Anhand dieser Daten kann postuliert werden, dass die Fragmente FYRC_B3 und FYRC_B1 durch Interaktion mit MLL_N bzw. der4_N die Interaktion der nativen Proteinfragmente MLL_N/der4_N und MLL_C verhindern und dies in der Folge zum Absterben der Zellen führt. Die Tatsache, dass diese Fragmente einen solch deutlichen Effekt auf die sehr therapieresistenten SEM Zellen haben, zeigt, dass die Inhibierung des intramolekularen Interaktionsinterface einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz für Leukämien mit einer Translokation t(4;11) darstellt.

2 EINLEITUNG

2.1 Leukämie

Das Krankheitsbild einer Leukämie zeichnet sich durch eine ungehinderte, abnorme Proliferation von Zellen des hämatopoietischen Systems aus. Durch die starke Anreicherung von lymphatischen bzw. myeloischen Blasten im Knochenmark wird die normale Hämatopoiese gestört (Hoffbrand *et al.*, 2006). Es kommt zu einer Ausschwemmung der Blasten in das periphere Blut und letztendlich zur Infiltration weiterer Organe. Dies tritt zumeist erst dann auf, wenn mehr als 60% der Knochenmarkszellen leukämische Blasten sind. Nähert sich die Zahl der leukämischen Zellen 10^{12} , so kommt es zur Entwicklung klinischer Symptome. Entsprechend dem Differenzierungsgrad der entarteten Zellen und dem Krankheitsverlauf unterscheidet man 4 Grundformen der Leukämie.

Tabelle 2-1: Klassifizierung von Leukämien

Akute Formen	Chronische Formen
Akute lymphatische Leukämie (ALL): L ₁ -L ₃	Chronische lymphatische Leukämie (CLL)
Akute myeloische Leukämie (AML): M ₀ -M ₇	Chronische myeloische Leukämie (CML)

Chronische Leukämien zeigen zu Beginn der Erkrankung nahezu keine Symptome und entwickeln sich nur langsam weiter. Oft wird die Diagnose in dieser ersten Phase als Zufallsdiagnose gestellt. Akute Leukämien werden neben der Einteilung in lymphatische oder myeloische Leukämien, anhand morphologischer Merkmale entsprechend den Kriterien der **French-American-British cooperative group (FAB)**, zusätzlich in verschiedene Subtypen unterteilt. In der Regel sind akute Leukämien mit schweren Krankheitssymptomen und Fieber assoziiert und können unbehandelt innerhalb weniger Wochen oder Monate zum Tod führen. Von einer akuten Leukämie spricht man, wenn mehr als 20% Blasten im Knochenmark nachweisbar sind. Die Häufigkeit des Auftretens verschiedener Leukämieformen variiert in Bezug auf verschiedene Altersklassen recht stark. Während im Erwachsenenalter hauptsächlich chronische Leukämien auftreten, findet man bei Kindern eine akute Leukämie sehr viel häufiger. Die akute lymphatische

Leukämie ist mit einem prozentualen Anteil von 27% die häufigste aller malignen Erkrankung im Kindesalter (Batzler *et al.*, 2008).

2.2 Chromosomale Translokationen als Ursache für Leukämien

Bei der molekulargenetischen Analyse leukämischer Blasten von Leukämiepatienten lassen sich sehr häufig balancierte chromosomale Translokationen feststellen. Als balanciert bezeichnet man eine Translokation, wenn während des Entstehungsprozesses weder Deletionen noch Duplikationen von genetischem Material auftreten (Pedersen-Bjergaard and Rowley, 1994). Im Falle der akuten Leukämien findet man diese genetische Aberration bei bis zu 65% der Patienten (Look, 1997). Die genaue Art der Translokation korreliert direkt mit der jeweiligen Erkrankungsart des hämatopoietischen Systems und dem klinischen Erscheinungsbild des Patienten. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass die chromosomalen Aberrationen ursächlich für die Tumorentstehung verantwortlich sind.

Man unterscheidet zwei verschiedene Typen, Typ A bzw. Typ B, von balancierten Translokationen:

Bei den Typ A Translokationen kommt es zu einer abnorm gesteigerten Aktivität eines Gens, indem dieses unter die Kontrolle eines starken Enhancer-Elements gebracht wird. Häufig werden auf diese Weise Proto-Onkogene aktiviert, die im Grundzustand in der entsprechenden Zelle (in der die Translokation auftritt) nur schwach oder gar nicht exprimiert werden. Typischerweise sind in diese Translokationen Regulator-Elemente von Immunglobulin- (*Ig*) oder T-Zell-Rezeptor (*TCR*)-Genen involviert. In diesen Bereichen treten Rekombinationen naturgemäß auf, um die Antigen-Rezeptor Varianz zu ermöglichen. Durch eine Fehlfunktion des zellulären Rekombinationssystems können bei diesem Prozess die beschriebenen Translokationen entstehen (Sánchez-García and Rabbitts, 1993). Dies erklärt, weshalb diese Form der Translokation auf lymphatische Zellen beschränkt ist.

Ein bedeutendes Beispiel der Typ A Translokationen ist die Translokation $t(8;14)(q24;q32)$, die mit dem Burkitt-Lymphom assoziiert ist. In diesem Fall wird das *c-MYC* Gen unter die regulatorische Kontrolle des *Ig Heavy chain (IgH)* Gens gebracht (Dalla-Favera *et al.*, 1982), was dessen dauerhafte Expression zur Folge hat. Dies verleiht der Zelle ein ungehindertes Proliferationspotential, erhöht jedoch gleichzeitig ihre Apoptose-Anfälligkeit (Klein, 2000). Zur vollständigen Transformation der Zelle sind jedoch noch weitere Mutationen erforderlich.

Weitaus häufiger findet man in leukämischen Zellen Translokationen vom Typ B. In diesem Fall finden die chromosomalen Brüche, die zur Translokation führen, in intronischen Bereichen von zwei verschiedenen Genen auf zwei verschiedenen Chromosomen statt. Die Fusion der zwei nicht-homologen Chromosomen resultiert in der Bildung von chimären Genen, die in Form von Fusionsproteinen exprimiert werden. Folglich kommt es bei den Typ B Translokationen zu einem Funktionsverlust der betroffenen Gene und gleichermaßen zu einem Funktionsgewinn durch die neu gebildeten chimären Gene.

Das erste beschriebene Beispiel für eine Translokation von diesem Typ ist die Translokation t(9;22) mit dem bekannten Philadelphia-Chromosom (Novell and Hungerford, 1960; Rowley, 1973; Teyssier *et al.*, 1985). Es kommt bei dieser Translokation zur Bildung der zwei Fusionsgene *ABL-BCR* auf Chromosom 9 sowie *BCR-ABL* auf Chromosom 22. Die resultierenden Fusionsproteine führen zur malignen Transformation der Zellen und lösen, je nach Ursprung bzw. Differenzierungsgrad der betroffenen Zellen, eine bestimmte Form der Leukämie aus (Huret, 1997a; Huret, 1997b; Huret, 1997c).

Außergewöhnlich häufig findet man bei Typ B Translokationen eine Beteiligung des *MLL* Gens (*Mixed Lineage Leukemia*) auf Chromosom 11 Bande q23. Insgesamt konnten bis heute für dieses Gen 51 verschiedene Translokationspartnergene auf molekularer Ebene charakterisiert werden, mindestens 36 weitere Rearrangements müssen noch genauer definiert werden (Meyer *et al.*, 2006b). Die unterschiedlichen Fusionen des *MLL* Gens führen zur Ausprägung verschiedener Leukämieformen (vgl. Abschnitt 2.4 Aberrationen des *MLL* Gens und assoziierte Leukämien).

Für eine Vielzahl weiterer Gene konnte eine Beteiligung an Translokationen des Typ A gezeigt werden. Häufig kodieren sie für Faktoren, welche für die Entwicklung und Differenzierung hämatopoietischer Zellen notwendig sind (Rabbitts, 1999).

2.3 Ursachen chromosomaler Translokationen

Eine Grundvoraussetzung für die Entstehung chromosomaler Translokationen ist das Auftreten von DNA-Doppelstrangbrüchen (DNA-DSB). Experimentell konnte dies über die Induktion von jeweils einem DNA-Doppelstrangbruch innerhalb von zwei defekten *Neomycin*-Resistenzgenen auf zwei verschiedenen Mauschromosomen nachgewiesen werden. Durch die dadurch ausgelöste DNA Reparatur wurde eine chromosomale Translokation induziert und dabei auf einem der beiden Chromosomen ein intaktes Resistenzgen generiert (Richardson and Jasin, 2000). Treten also zwei DNA-DSB auf zwei nicht-homologen Chromosomen auf, so kann dies zur Ausbildung von reziproken

Translokationen führen. Die dabei entstehende genetische Situation ist häufig mit der Entwicklung von Tumoren assoziiert.

DNA-DSB treten in einigen Genen, z. B. in den Genen der Immunglobuline und der T-Zell-Rezeptoren, natürlicherweise auf. Hier stellen sie eine Grundvoraussetzung zur Bildung der Antikörper- bzw. T-Zell-Rezeptor-Varianz dar. Für die Translokation $t(8;14)(q24;q11)$, welche das *c-MYC* Gen in die konstante Region der alpha-Kette des T-Zell-Rezeptors transloziert, konnte gezeigt werden, dass beide Bruchpunkte Signal-Sequenzen für die V-J-Rekombination aufweisen. Daher kann man davon ausgehen, dass dieses Fehl-Rearrangement während der Rekombinationsprozesse der V-J-Fragmente entsteht (Finger *et al.*, 1986).

Es gibt jedoch eine Vielzahl weiterer Gene, die vermehrt in reziproke Translokationen involviert sind und bei denen ein Doppelstrangbruch nicht für die weitere Differenzierung essentiell ist. Die Doppelstrangbrüche treten bei diesen Genen nicht gleichmäßig über die gesamte Länge verteilt auf, sondern sind oft in mehr oder weniger begrenzten Bereichen zu finden. Diese Bereiche bezeichnet man als Bruchpunktsclusterregion (*bcr*, aus dem Englischen *breakpoint cluster region*). Innerhalb der *bcr* von verschiedenen Genen, beispielsweise *MLL*, *AML1* und *ETO*, konnten keine Sequenz-Homologien festgestellt werden. Vielmehr zeigt sich häufig eine Co-Lokalisierung mit strukturellen Chromatin-Elementen, wie Topoisomerase II Consensus-Sequenzen, DNaseI hypersensitiven Stellen sowie *scaffold attachment regions* (SARs) (Broeker *et al.*, 1996; Felix *et al.*, 1995; Hensel *et al.*, 2001; Strissel *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2002). Dies legt eine Beteiligung dieser strukturellen Eigenschaften an der Entstehung Leukämie-assoziiierter chromosomaler Translokationen nahe.

Entstehen chromosomale Translokationen spontan durch einen unbekannten Auslöser, spricht man von *de novo* oder primären Leukämien. Sie können jedoch auch infolge einer Behandlung mit Chemotherapie und/oder Bestrahlung auftreten. In diesem Fall verwendet man die Bezeichnung sekundäre oder Therapie-assoziierte Leukämie (t-AML bzw. t-ALL). Erhalten Patienten beispielsweise eine Behandlung mit Etoposid oder Teniposid (Topoisomerase II-Inhibitoren), so kann es zur Ausbildung einer t-AML kommen, die letztendlich auf eine induzierte balancierte Translokation zurückzuführen ist. Überwiegend sind bei den betroffenen Patienten nach Etoposid-Behandlung Aberrationen des *MLL* Gens (11q23) (bei 33% der Patienten) oder des *AML1* Gens (21q22) (bei 15% der Patienten) zu finden (Pedersen-Bjergaard and Philip, 1991; Ratain *et al.*, 1987; Rowley and Olney, 2002).

In allen beschriebenen Situationen ist für die Entstehung einer chromosomalen Translokation jedoch nicht nur der DNA-DSB eine Voraussetzung, auch die

nachfolgende Reparatur ist entscheidend. Die Klonierung der Bruchpunkte von verschiedenen reziproken Translokationen (z.B. t(4;11), t(9;11) und t(11;16)) ermöglichte es, spezifische Sequenz-Veränderungen an den Fusionsstellen zu detektieren und somit den zugrunde liegenden Reparatur-Mechanismus zu definieren. Das Auftreten von Deletionen, Duplikationen, Inversionen, *filler-DNA* (*non-template insertions*), sowie sogenannten *mini direct repeats* spricht insgesamt für eine Beteiligung des *non-homologous end joining* (NHEJ) Systems (Gillert *et al.*, 1999; Reichel *et al.*, 1998; Roth *et al.*, 1989; Roth *et al.*, 1985; Roth and Wilson, 1986; Super *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2004). Mit diesem zellulären System, welches auch bei der V(D)J-Rekombination zum Einsatz kommt, können DNA-Enden miteinander verknüpft werden, die keine Homologien aufweisen (Rooney *et al.*, 2004). Der Einsatz des NHEJ-Systems bedingt das beschriebene Aufkommen von Sequenz-Veränderungen wie beispielsweise Deletionen oder Insertionen, ohne die eine Verknüpfung der beiden nicht-homologen DNA-Stränge nicht möglich wäre.

2.4 Aberrationen des *MLL* Gens und assoziierte Leukämien

Wie bereits der Name *MLL*, *Mixed Lineage Leukemia* oder *Myeloid, Lymphoid Leukemia*, suggeriert, können Aberrationen des Gens sowohl myeloische als auch lymphatische Leukämien hervorrufen. Je nach Leukämie-Form und Altersgruppe der Patienten findet man zu unterschiedlichen prozentualen Anteilen eine Abnormität des *MLL* Gens. Im Kleinkind- und Erwachsenenalter liegt die Häufigkeit von primären Leukämien, welche mit einem *MLL* Rearrangement assoziiert sind, bei 7-10% für akute lymphatische Leukämien und bei 3-5% für die myeloische Form. Für Therapie-induzierte Leukämien, die vorwiegend als t-AML ausgeprägt sind, liegt der Wert ebenfalls bei ca. 10%. Anders verhält es sich für ALL und AML Fälle von Säuglingen mit einem Alter von bis zu einem Jahr, wo bei ca. 70% der Patienten eine Translokation des *MLL* Gens vorliegt (Chen *et al.*, 1993b; Schoch *et al.*, 2003; Thirman *et al.*, 1993). Untersuchungen an Zwillingen im Säuglingsalter zeigen, dass die genetische Aberration bereits während der fötalen Hämatopoiese *in utero* in sehr frühen Zellen entstehen (Ford *et al.*, 1993; Super *et al.*, 1994).

Derzeit sind 87 verschiedene Rearrangements des *MLL* Gens beschrieben und es konnten bereits 51 Translokationspartner auf molekularer Ebene charakterisiert werden (Meyer *et al.*, 2006b). Neben reziproken Translokationen des Gens treten Inversionen, Deletionen sowie partielle Duplikationen auf (DiMartino and Cleary, 1999; Schichman *et al.*, 1994). *MLL* Rearrangements dieser Art verursachen nur etwa 5% aller *MLL*-assoziierten akuten Leukämien bei Kindern und Erwachsenen, während reziproke

Translokationen für die übrigen 95% verantwortlich sind. Bei quantitativer Analyse der verschiedenen Translokationspartner zeigen sich einige wenige Gene, welche in ihrer Häufigkeit als Partnergen überwiegen. Die 6 häufigsten Gene sind *AF4*, *AF6*, *AF9*, *AF10*, *ENL* sowie *ELL* (*AF(v) = ALL-1 Fused gene from chromosome (v)variable, Eleven Nineteen Leukemia* bzw. *Eleven nineteen Lysin rich Leukemia*). Die genaue Frequenz, mit der ein bestimmtes Gen als Translokationspartner zu finden ist, variiert mit der Form der Leukämie und/oder dem Alter des Patienten (Meyer *et al.*, 2009). Einige Partnergene können sowohl in die Ausbildung lymphatischer als auch myeloischer Leukämien involviert sein, während andere ausschließlich für eine Leukämie-Form charakteristisch sind (siehe Abbildung 2-1). Dies veranschaulicht eine funktionelle Beteiligung des Translokationspartners an der Entstehung der Leukämie.

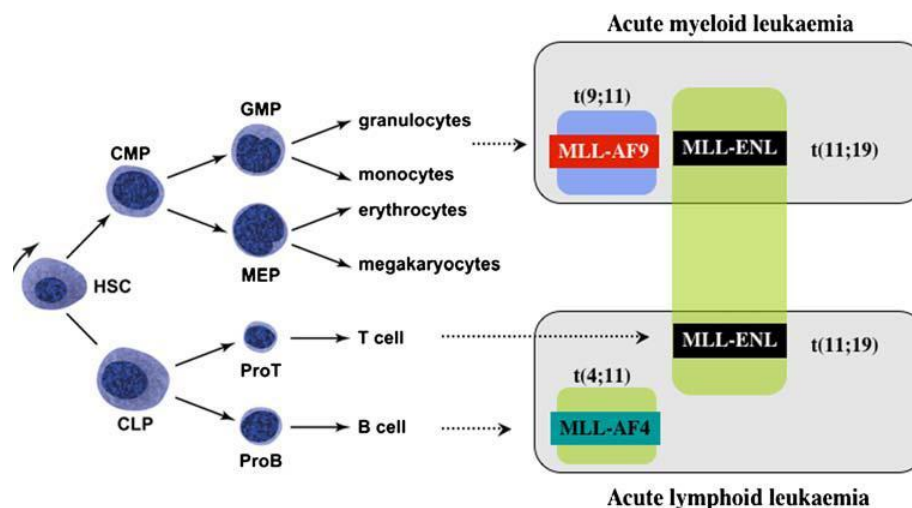


Abbildung 2-1: Zellulärer Tropismus der 3 häufigen Fusionen *MLL-AF4*, *MLL-AF9* und *MLL-ENL*. Dargestellt sind die Haupt-Zelltypen des hämatopoietischen Systems und das Vorkommen der drei *MLL* Fusionen. Eine *MLL-AF4* Fusion findet man ausschließlich im lymphatischen Zweig. Das Vorkommen einer *MLL-AF9* Fusion hingegen ist auf die myeloische Linie beschränkt. Eine *MLL-ENL* Fusion kann sowohl in lymphatischen, als auch in myeloischen Zellen gefunden werden. CLP *common lymphoid progenitor*, CMP *common myeloid progenitor*, GMP *granulocyte-monocyte precursor*, HSC *hematopoietic stem cell*, MEP *megakaryocyte-erythrocyte precursor* (aus Rodriguez-Perales *et al.*, 2008).

Sehr deutliche Unterschiede bezüglich der prozentualen Beteiligung eines Gens bestehen außerdem zwischen primären Leukämien und Therapie-induzierten Leukämien (siehe Abbildung 2-2) (Daser and Rabbitts, 2005).

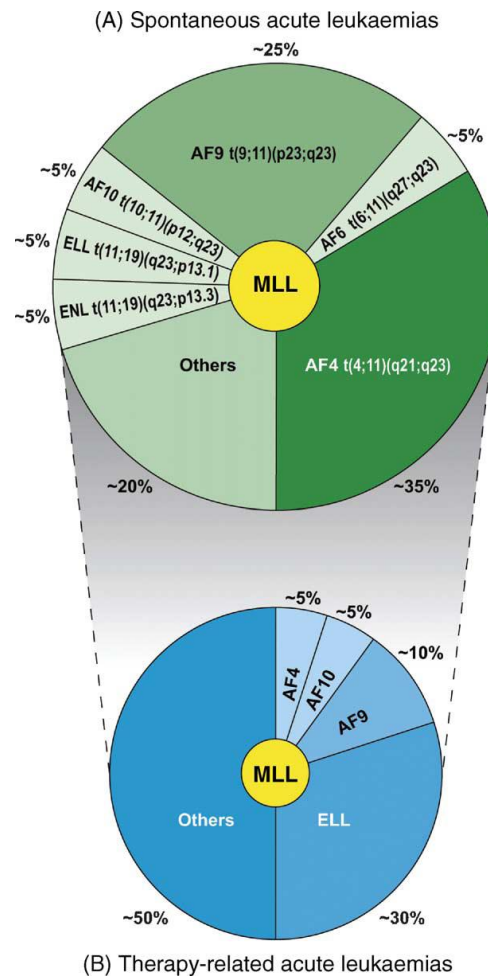


Abbildung 2-2: Verteilung und Häufigkeit der Translokationspartner bei *de novo* und Therapie-induzierten *MLL* Translokationen. a) Verteilung bei *de novo* Leukämien, der häufigste Translokationspartner ist hier das *AF4* Gen. b) Verteilung bei Therapie-induzierten Leukämien, die insgesamt 5-10% aller Leukämien mit *MLL* Rearrangement ausmachen; den häufigsten Translokationspartner stellt hier das *ELL* Gen (aus Daser and Rabbitts, 2005).

Während bei primären akuten Leukämien mit lymphatischer Ausprägung das *AF4* Gen (4q21) mit 35% den häufigsten Translokationspartner darstellt, ist es bei sekundären Leukämien nur in 5% der Fälle involviert. Der häufigste Fusionspartner bei *de novo* Leukämien der myeloischen Linie ist das *AF9* Gen (9p23) mit 25%, bei der Therapie-induzierten Form findet man es lediglich bei 10% der Betroffenen. Diese Form wird durch das *ELL* Gen (19p13.1) als Translokationspartner dominiert, welches hier einen Anteil von 30% hat. Seine Beteiligung bei primären Leukämien liegt hingegen nur bei 5%. Die Gene *ENL* (19p13.3) und *AF6* (6q27) konnten ausschließlich bei *de novo* Leukämien als Partnergene detektiert werden und treten mit einer Häufigkeit von 7% bzw. 5% auf. Für das *AF10* Gen (10p12) wurde kein Unterschied in der Frequenz seiner Beteiligung an

den verschiedenen Leukämie-Formen festgestellt. Es ist gleichermaßen an *de novo* Leukämien, als auch an Therapie-induzierten Leukämien zu 5% beteiligt.

Generell lassen sich Translokationspartner des *MLL* Gens aufgrund ihrer Funktion in zwei Gruppen einteilen (DiMartino and Cleary, 1999).

Auf der einen Seite gibt es einige Gene, die transkriptionell-aktivierendes Potential aufweisen und zu denen die hier genannten Haupt-Translokationspartner zählen. Es wird vermutet, dass die Transformation der Zellen in diesem Fall auf dem fehlgeleiteten aktivierenden Potential der Proteine beruht. Eine experimentelle Bestätigung lieferten Versuche mit funktionellen Domänen dieser Proteine in Form entsprechender Fusionsproteine, die zur Ausprägung onkogener Eigenschaften führten (DiMartino *et al.*, 2002; Luo *et al.*, 2001; Slany *et al.*, 1998; So and Cleary, 2003). Für einige der Fusionsproteine etablierten verschiedene Arbeitsgruppen transgene Mausmodelle, mit denen ein funktioneller Nachweis für die Induktion hämatopoietischer Malignome geschaffen wurde (Corral *et al.*, 1996; DiMartino *et al.*, 2002; Lavau *et al.*, 2000a; Lavau *et al.*, 2000b; Lavau *et al.*, 1997; Luo *et al.*, 2001; So and Cleary, 2002). Interessanterweise bilden einige der genannten nukleären Proteine ein gemeinsames Protein-Netzwerk, eine Erkenntnis die zusätzlich einen prinzipiellen Wirkmechanismus suggeriert. Neben einer Interaktion der Proteine AF4 und AF9 wurde ebenfalls eine Interaktion von ENL mit AF4 und AF10 nachgewiesen (Erfurth *et al.*, 2004; Zeisig *et al.*, 2005).

Auf der anderen Seite steht eine Gruppe cytoplasmatischer Proteine, wie beispielsweise AF1p, GAS7 und SEPT6. Da sie keinerlei transkriptionell-regulierendes Potential besitzen, kann der oben beschriebene Transformations-Mechanismus ausgeschlossen werden. Der Befund, dass viele dieser Proteine Di- bzw. Oligomerisierungsmotive aufweisen, lässt die Vermutung zu, dass in diesen Fällen eine induzierte Multimerisierung der Fusionsproteine in einer Transformation resultiert. Gestützt wird diese These durch das Auftreten einer Leukämie durch ein künstliches Fusionsprotein aus *MLL* und der bakteriellen β -Galactosidase, welche in Lösung Tetramere bildet (Dobson *et al.*, 2000). Weitere Experimente diesbezüglich unterstreichen eine Beteiligung der *MLL* Dimerisierung an dem onkogenen Transformationspotential einiger Fusionsproteine (Martin *et al.*, 2003; So *et al.*, 2003). Eine forcierte Dimerisierung des N-terminalen *MLL* Fragments genügte für die Transformation von Zellen, während es in monomerer Form unwirksam blieb (Corral *et al.*, 1996; Lavau *et al.*, 1997). Durch diese Beobachtungen konnte auch ausgeschlossen werden, dass ein Verlust der Heterozygotität des *MLL* Gens die Transformation vermittelt.

Der gemeinsame Effekt aller *MLL* Translokationen scheint die Fehlregulation einiger weniger Gene zu sein. Im Mausmodell bewirken nahezu alle untersuchten *MLL* Fusionsproteine eine Überexpression von *Hox* Genen, hauptsächlich *Hoxa7* und *Hoxa9*, sowie des Co-Faktors *Meis1* (Ayton and Cleary, 2003; Ferrando *et al.*, 2003; Zeisig *et al.*, 2004). Dies gilt gleichermaßen für die dimere Form des *MLL*-N-Terminus (Martin *et al.*, 2003). Im Normalzustand werden die genannten Gene nur recht früh in hämatopoietischen Stammzellen exprimiert, mit zunehmender Differenzierung wird die Expression herunterreguliert (Pineault *et al.*, 2002). In Anwesenheit eines transformierenden *MLL* Fusionsproteins bleibt die Expression hingegen dauerhaft bestehen. Diese Veränderungen scheinen für die Leukämogenese ausschlaggebend zu sein, denn sie treten ebenfalls in Leukämie-Patienten mit *MLL* Translokationen auf (Armstrong *et al.*, 2002; Ferrando *et al.*, 2003; Rozovskaia *et al.*, 2001). Eine neuere Arbeit zeigt zudem, dass die Anwesenheit von *Meis1* für Entstehung von leukämischen Stammzellen essentiell ist (Wong *et al.*, 2007).

Die Aufklärung der zugrunde liegenden Translokation bei jedem einzelnen Patienten erweist sich als äußerst wichtig, da verschiedene Translokationen die Anwendung unterschiedlicher Therapie-Protokolle bedingen. Zur Aufklärung der genomischen Aberration stehen verschiedene Methoden zu Verfügung. Die sensitivste Methode ist zurzeit die LDI-PCR (*Long Distance Inverse PCR*), mit der eine Patienten-spezifische Kartierung des Bruchpunkts und die Bestimmung des beteiligten Partnergens anhand genomischer DNA-Analysen möglich ist. Für jeden Patienten erhält man eine einzigartige Fusionssequenz, die zusätzlich für das MRD-Monitoring (*Minimal Residual Disease*) verwendet werden kann (Kowarz *et al.*, 2007; Meyer *et al.*, 2005).

2.5 Die Translokation t(4;11)

Die Translokation vom Typ t(4;11) konnte erstmals 1979 bei Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie identifiziert werden (den Berghe *et al.*, 1979). Die spätere Identifizierung eines *Yeast Artificial Chromosome* (YAC), welches den betroffenen Bereich auf Chromosom 11 abdeckte, führte letztendlich zur Charakterisierung eines beteiligten Gens, welches als *Mixed Lineage Leukemia* oder *Myeloid/Lymphoid Leukemia* (*MLL*) Gen bezeichnet wurde (de Poel *et al.*, 1991; Rowley *et al.*, 1990). Als Partnergen konnte kurze Zeit später das *AF4* (*ALL-1 Fused gene from chromosome 4*) oder auch *FEL* (*Four Eleven Leukemia*) Gen auf Chromosom 4q21 identifiziert werden (Gu *et al.*, 1992; Morrissey *et al.*, 1993). Typischerweise kommt es durch die Translokation zur Bildung zweier reziproker Derivat-Chromosomen. Das Derivat 11 Chromosom mit dem fusionierten *Derivat 11* Gen (*der11*) besteht im centromeren

Bereich aus dem N-Terminus des *MLL* Gens und im telomeren Bereich aus dem C-Terminus des *AF4* Gens. Entsprechend besteht das *Derivat 4* Gen (*der4*) auf dem reziproken Derivat 4 Chromosom aus dem N-terminalen Bereich des *AF4* Gens und dem C-Terminus des *MLL* Gens.

2.5.1 Klinische Charakteristika einer *t(4;11)*

Generell werden Leukämien, die durch eine *t(4;11)* Translokation hervorgerufen werden, als Hoch-Risiko-Leukämie eingestuft. Dies beruht auf der schlechten Therapierbarkeit, wie auch auf der schlechten Prognose, mit der diese Leukämien verbunden sind. Zeigen Patienten zu Beginn der Therapie eine Remission, so kommt es sehr schnell zur Ausbildung eines Rezidivs, welches sich im Folgenden als resistent gegenüber der gewählten Therapie erweist (Heerema *et al.*, 1999). Vielfach ist mit einer Translokation von diesem Typ ein sehr junges Alter bei Diagnosestellung verbunden. 67% der *t(4;11)*-positiven ALL-Patienten sind Säuglinge mit einem Alter bis zu 6 Monaten. Das Alter der Patienten kann als prognostischer Marker herangezogen werden. Generell sprechen Patienten im Alter zwischen 1 Jahr und 9 Jahren besser auf Therapien an, als Patienten außerhalb dieser Altersgruppe (<1 Jahr oder >9 Jahre) (Pui *et al.*, 1994; Pui *et al.*, 1991). Vergleicht man den Krankheitsverlauf aller ALL-Patienten mit einer Translokation *t(4;11)* mit dem Krankheitsverlauf von Patienten ohne bzw. mit einer differentiellen 11q23 Aberration, wird eine allgemein schlechtere Prognose deutlich. Eine Studie mit 56 an ALL erkrankten Kleinkindern mit und ohne *t(4;11)*, zeigte über einen Zeitraum von 60 Monaten ein **Event Free Survival (EFS)** von $\approx 45\%$ der *t(4;11)*-negativen Kinder, im Vergleich zu nur 4,8% bei *t(4;11)*-positiven Patienten (Heerema *et al.*, 1999). In einer weiteren Studie stellte sich heraus, dass *MLL* Aberrationen prinzipiell, unabhängig vom Alter der Patienten und vom Translokationspartner, eine schlechte Prognose vermitteln (Behm *et al.*, 1996).

Die Klassifizierung der leukämischen Blasten erfolgt gemäß den *FAB*-Kriterien nach morphologischen und immunphänotypischen Gesichtspunkten. Morphologisch erfolgt eine Zuordnung der Blasten von *t(4;11)*-Patienten zur lymphatischen Linie. Bei der Immunphänotypisierung zeigen sich neben typischen lymphatischen Markern wie CD19 und CD45 auch myeloische Marker wie CD15, CD65 und HLA-DR (Borkhardt *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 1993b; Pui *et al.*, 1991). Ein weiteres Charakteristikum von Zellen mit 11q23 Aberration ist das Fehlen des CD10 Markers, welcher typischerweise auf frühen Zellen des lymphatischen Zweigs gefunden wird (Borkhardt *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 1993b; Heerema *et al.*, 1999; Pui *et al.*, 1991). Diese Charakteristika lassen vermuten, dass die Aberrationen des *MLL* Gens bereits in pluripotenten Vorläuferzellen erfolgen,

die noch in der Lage sind sowohl in den lymphatischen als auch in den myeloischen Zweig des blutbildenden Systems zu differenzieren. Zusammengefasst führen die genannten Eigenschaften zur Einteilung der t(4;11)-positiven Leukämien als pro-B-Zell Leukämie.

Auffällige klinische Merkmale von Patienten mit einer Translokation des Typs t(4;11) sind Hyperleukozytose mit $>50 \times 10^6$ Blasten/ml (in etwa 60% der Fälle sogar $>10 \times 10^9$ /ml), starke Infiltration des Zentralnervensystems sowie Hepatosplenomegalie (Chen *et al.*, 1993b; Felix *et al.*, 1999; Heerema *et al.*, 1999; Johansson *et al.*, 1998; Pui *et al.*, 1991). Die beobachtete Hyperleukozytose sowie die Infiltration weiterer Organe ist vermutlich auf eine verminderte Apoptose- bzw. Nekrose-Anfälligkeit der Zellen zurückzuführen. Analysen von t(4;11)-positiven Zelllinien zeigen, dass diese im Gegensatz zu anderen lymphatischen Leukämie-Zellen nicht mit Apoptose auf induzierten Stress reagieren (Kersey *et al.*, 1998).

2.5.2 Die beteiligten Gene *MLL* und *AF4*

***MLL* Gen**

Das *MLL* Gen wurde erstmals als genereller Translokations-Hotspot auf Chromosom 11 Bande q23 in akuten Leukämien beschrieben. In den meisten Fällen handelt es sich um Leukämien lymphatischen Ursprungs, weshalb Cimino *et al.* die Bezeichnung *ALL-1* (*Acute Lymphocytic Leukemia-1*) für das Gen auswählten (Cimino *et al.*, 1991; Gu *et al.*, 1992). Aufgrund großer Homologien zu dem Trithorax Protein aus *Drosophila melanogaster* wählten andere Arbeitsgruppen die Bezeichnung *Htrx* bzw. *HRX* (Human trithorax) (Djabali *et al.*, 1992; Tkachuk *et al.*, 1992). Im Folgenden wird die Bezeichnung *MLL* verwendet.

Insgesamt erstreckt sich das Gen über einen Bereich von ca. 92 Kilobasen (kb) und besitzt 37 Exons (Nilson *et al.*, 1996; Rasio *et al.*, 1996). Genauere Kartierungen und Analysen des entsprechenden Bereiches auf Chromosom 11q23 führten zur Beschreibung eines Transkripts mit einer Größe von 15 kb. Zusätzlich konnten zwei weitere Transkriptvarianten mit Größen von 13,5 bzw. 5 kb gefunden werden, ihre Funktion ist jedoch nicht bekannt (Djabali *et al.*, 1992; Tkachuk *et al.*, 1992). Durch alternatives Spleißen des größten Transkripts können zwei unterschiedliche offene Leserahmen (*ORF* von *Open Reading Frame*) mit 12.018 bzw. 11.919 Nukleotiden entstehen, welche sich nur durch das Vorhandensein eines Exons (Exon 2) unterscheiden (Domer *et al.*, 1993). Der *ORF* mit 12.018 Nukleotiden kodiert für ein Protein mit 4.005 Aminosäuren (AS), weitaus häufiger findet man in den Zellen jedoch

die kleinere Spleiß-Variante und das zugehörige Protein mit 3.972 AS (Meyer *et al.*, 2006a; Nilson *et al.*, 1996). Häufig findet eine zusätzliche Deletion von 9 bp im Exon 15 statt, so dass die gebildeten Proteine eine Größe von 4.002 bzw. 3.969 AS aufweisen. Letzteres wurde, unter Verwendung der von Nilson *et al.* eingeführten Nomenklatur, in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Die Doppelstrangbrüche innerhalb des Gens, welche für die Entstehung der Leukämie Voraussetzung sind, akkumulieren in einem relativ begrenzten Bereich. Der als Bruchpunktsclusterregion *bcr* bezeichnete Bereich erstreckt sich über 8,3 kb und reicht von Exon 8 bis einschließlich Exon 14. Nahezu alle bis heute detektierten Brüche des *MLL* Gens liegen innerhalb dieses Bereichs (Mitterbauer-Hohendanner and Mannhalter, 2004; Reichel *et al.*, 2001). Für die Entstehung funktionsfähiger Derivat-Chromosomen ist die Phase der Introns, welche durch die Translokation miteinander fusioniert werden, essentiell. Rekombinieren zwei Introns unterschiedlicher Phase miteinander, so kommt es unweigerlich zu einer Verschiebung des Leserasters und damit zum Abbruch der kodierenden Sequenz. Analysen der Intron-Phasen innerhalb der *bcr* zeigten, dass bis auf das Intron 8 (mit der Phase 1) alle vorhandenen Introns die Phase 0 aufweisen (Marschalek *et al.*, 1997). Alle bisher charakterisierten Introns verschiedener Translokationspartnerogene haben ebenfalls die Phase 0. Daher sind alle Translokationen *in frame* und können entsprechend positiv selektioniert werden. Weitere strukturelle Analysen der *bcr* führten zu der Aufdeckung von Topoisomerase II Konsensussequenzen, DNaseI hypersensitiven Stellen sowie SARs (Broeker *et al.*, 1996; Felix *et al.*, 1995; Hensel *et al.*, 2001; Strissel *et al.*, 1998). Zusätzlich finden sich in diesem Bereich ungewöhnlich viele repetitive Alu-Elemente (Gu *et al.*, 1994). Es wurde vermutet, dass durch die Alu-Elemente eine homologe Rekombination vermittelt wird und dass das *MLL* Gen aufgrund der hohen Anzahl entsprechend oft in Translokationen involviert sein könnte. Bruchpunktsanalysen von Patienten mit reziproken Translokationen zeigten, dass tatsächlich Brüche innerhalb der repetitiven Alu-Elemente stattfinden. Dies erfolgt jedoch nie parallel in beiden, sondern immer nur in einem beteiligten Gen (Gillert *et al.*, 1999; Reichel *et al.*, 2001; Reichel *et al.*, 1998). Demnach kann das Auftreten einer reziproken Translokation durch homologe Rekombination nahezu ausgeschlossen werden. Im Gegensatz dazu steht die erwähnte partielle Duplikation des *MLL* Gens, welche nachweislich durch die repetitiven Elemente vermittelt wird (Schichman *et al.*, 1994; Strout *et al.*, 1998).

Eine exakte Kartierung der Bruchpunkte innerhalb der *bcr* legte eine inhomogene Verteilung offen und führte zu der Beschreibung zweier sogenannter Subcluster, Subcluster I und II, innerhalb derer die meisten Brüche akkumulieren (Reichel *et al.*,

2001). Interessanterweise besteht ein Zusammenhang zwischen der jeweiligen Leukämie-Form und dem exakten Ort des zugehörigen Bruchpunkts. Bei Patienten mit einer Therapie-induzierten Leukämie (hauptsächlich t-AML, jedoch nicht bei t(4;11)), liegen die Brüche nahezu ausnahmslos in dem telomer-gelegenen Subcluster II, welcher durch das Vorkommen von SARs und mindestens einer hoch-affinen Topoisomerase II Bindungsstelle charakterisiert ist (Broeker *et al.*, 1996; Cimino *et al.*, 1997). Insgesamt wurden sieben Topoisomerase II Konsensussequenzen beschrieben, aber nur eine zeigte sich in entsprechenden *in vivo* Versuchen als tatsächliche Schnittstelle. Diese befindet sich in Exon 12 des *MLL* Gens (Aplan *et al.*, 1996; Broeker *et al.*, 1996; Gu *et al.*, 1994). Neben den Brüchen von t-AML Patienten sammeln sich ebenfalls die Brüche von Patienten im Säuglingsalter (<1Jahr) in diesem Bereich (Cimino *et al.*, 1997; Reichel *et al.*, 2001). Möglicherweise ist dies auf eine Exposition des Fötus gegenüber Topoisomerase II inhibierenden Agenzien während der Schwangerschaft zurückzuführen. Hier kommen vor allem Bioflavonoide in Betracht (Ross, 2000; Strick *et al.*, 2000). Bei *de novo* Leukämien von Patienten in anderen Altersklassen (>1 Jahr) liegt der größte Anteil der Brüche im Subcluster I (Reichel *et al.*, 2001). Diese auffallende Verteilung der Brüche lässt eine unterschiedliche Ursache bzw. einen unterschiedlichen Entstehungsmechanismus der Translokationen für die zwei Subgruppen vermuten (Broeker *et al.*, 1996). Eine alternative, sehr schlüssige Erklärung für diese Auffälligkeit stützt sich auf die Annahme, dass gewisse chromosomale Bereiche innerhalb der *bcr* zu bestimmten Entwicklungszeitpunkten zugänglicher für DNA-DSB sind als andere.

AF4 Gen

Das Partnergen des *MLL* bei der t(4;11) Translokation liegt auf Chromosom 4q21 und trägt die Bezeichnung *AF4* (oder auch *FEL*) (Gu *et al.*, 1992; Morrissey *et al.*, 1993). Es ist bis heute keine andere chromosomale Translokation beschrieben, die ebenfalls dieses Gen involviert. Die Gesamtlänge des Gens umfasst mehr als 300 kb. Die 23 Exons bilden ein Transkript mit einer Größe von 10,5 kb (Chen *et al.*, 1993a; Nilson *et al.*, 1997; Werner, 1999). Von diesen 23 Exons werden die ersten 4, nämlich 1a1, 1a2 (welche zusammen Exon 1a bilden), 1b und 1c alternativ verwendet. In Anlehnung an das jeweilig verwendete Exon wurden zwei Transkripte FelA (Verwendung von Exon 1a) und FelB (Verwendung von Exon 1b) beschrieben. Die resultierenden Proteine unterscheiden sich ausschließlich in ihrem N-terminalen Bereich, haben eine Größe von 1.211 bzw. 1.218 AS und ein Molekulargewicht von ca. 130 kDa (Morrissey *et al.*, 1993; Nakamura *et al.*, 1993). Bei der Analyse der Exon/Intron Struktur des *AF4* Gens wurde eine zusätzliche Polyadenylierungsstelle im Intron 3 aufgedeckt. Findet diese frühe

Stelle Verwendung, kommt es zur Bildung eines Transkripts mit einer Größe von nur 2,8 kb. Entsprechend der eingeführten Nomenklatur für die zwei anderen Transkripte erhielt dieses kurze Transkript die Bezeichnung FelC (Nilson *et al.*, 1997).

Analog zum *MLL* Gen wurden auch die Brüche innerhalb des *AF4* Gens bei verschiedenen Patienten kartiert. Auch hier zeigt sich, dass die Brüche nicht über das gesamte Gen verteilt auftreten, sondern dass es zu einer Akkumulation in einer begrenzten Region, der *bcr*, kommt. Sie erstreckt sich über einen genomischen Bereich von etwa 44 kb. Bei genauer Analyse wurde gezeigt, dass die *bcr* den Bereich zwischen den Exons 3 und 6 überspannt und dass der Hauptanteil der Brüche in Intron 3 stattfindet (Reichel *et al.*, 2001; Reichel *et al.*, 1999). Wie bereits erwähnt, müssen die zwei an einer Translokation beteiligten Introns die gleiche Phase aufweisen, damit es zu einem intakten Leserahmen und damit zu Erzeugung eines funktionsfähigen Proteins kommt. Analysen belegen, dass die Introns 3 - 5 innerhalb der *bcr* des *AF4* Gens die Phase 0 aufweisen (Nilson *et al.*, 1997). Dies gilt auch für die Introns 9 - 13 in der *bcr* des *MLL* Gens, so dass reziproke Translokationen zwischen diesen beiden Bereichen vermutlich immer zu einem intakten Fusionsprotein führen (Nilson *et al.*, 1996). Intron 6 des *AF4* Gens sowie Intron 8 des *MLL* Gens haben die Phase 1, so dass auch hier eine Translokation zur Bildung eines vollständigen Fusionsproteins führt. Erstaunlicherweise wurde bisher keine Translokation beschrieben, welche den Bruchpunkt im Intron 2 des *AF4* Gens aufweist, obwohl auch dieses die Phase 0 hat. Offenbar bewirken nur diejenigen Translokationen, welche die Bruchpunkte innerhalb der Bruchpunktsregionen haben, eine bestimmte Konstellation funktioneller Domänen, die letztlich den betroffenen Zellen einen Selektionsvorteil verleiht. Neben der generellen Kartierung der Bruchpunkte, wurde ihre Lokalisation auch in Abhängigkeit des Patientenalters bestimmt. Für Patienten im Säuglingsalter (<1Jahr) wurde eine leicht heterogene Verteilung der Brüche mit einer schwachen Häufung im centromeren Bereich der *bcr* festgestellt. Im Gegensatz hierzu zeigten Patienten höheren Alters eine gleichmäßige Verteilung der Brüche über die gesamte Region (Reichel *et al.*, 2001). Die inhomogene Verteilung der Bruchpunkte ist demnach in der *bcr* des *MLL* Gens deutlich stärker ausgeprägt.

Strukturell betrachtet konnten innerhalb der *bcr* des *AF4* Gens 26 repetitive Alu-Elemente detektiert werden. Bei 19 dieser 26 Elemente handelt es sich um vollständige Elemente (300 bp), während die restlichen 7 verkürzte Varianten darstellen (<250 bp). Wie bereits beschrieben, konnte jedoch die Vermutung, dass eine Alu-Alu vermittelte homologe Rekombination die Ursache für die Translokationen darstellt, nicht bestätigt werden. Zusätzlich wurden bei der strukturellen Analyse zwei perfekte Topoisomerase II

Konsensussequenzen gefunden, diese konnten aber in keinem Fall einem Bruchpunkt zugeordnet werden (Reichel *et al.*, 1999). Demnach kann keine direkte Korrelation zwischen den strukturellen Eigenschaften des *AF4* Gens und den kartierten Brüchen hergestellt werden.

2.5.3 Aufbau der Wildtyp Proteine MLL und AF4

MLL Protein

Das MLL Protein wird von 37 Exons kodiert und ist mit einer Länge von maximal 4005 AS und einem Molekulargewicht von 435 kDa ein sehr großes Protein. Expressionsanalysen wiesen die Anwesenheit des Proteins in nahezu allen Geweben nach, beispielsweise in Herz, Lunge, Leber, sowie in hämatopoietischen Zellen. MLL weist deutliche Homologien zu den Proteinen Trithorax der Taufliege *Drosophila melanogaster* und Mll der Maus auf (Djabali *et al.*, 1992; Ma *et al.*, 1993; Tkachuk *et al.*, 1992). Aufgrund ihrer Gemeinsamkeiten zählen sie alle zur Trithorax-Familie. Proteine dieser Familie können über bestimmte Histonmodifikationen Veränderungen in der Chromatinstruktur hervorrufen und auf diese Weise die Expression von Genen ermöglichen. Ohne diese Proteine kann eine initiierte Expression nicht aufrechterhalten werden (Hanson *et al.*, 1999). Durch ein Zusammenwirken mit den antagonistischen Proteinen der Polycomb-Familie wird die Expression bzw. Repression verschiedener Gene genau reguliert. Der modulare Aufbau des MLL Proteins mit einigen konservierten Domänen ist in Abbildung 2-3 dargestellt.

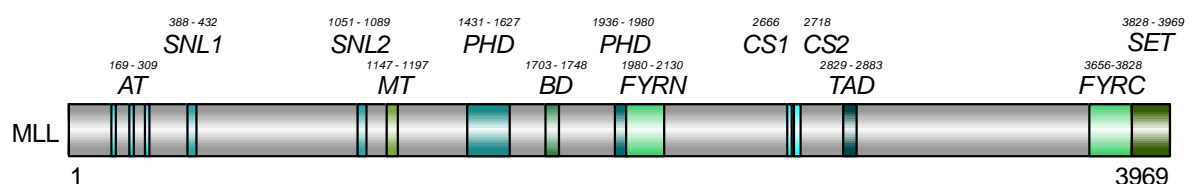


Abbildung 2-3: Modularer Aufbau des MLL Proteins. Die Aminosäure-Positionen der einzelnen Domänen sind angegeben. Die Gesamtlänge des Proteins beträgt 3969 Aminosäuren.

Die größte Homologie zum *Drosophila* Protein Trithorax wurde für den C-Terminus mit 81% beschrieben (Tkachuk *et al.*, 1992). In diesem Bereich liegt die SET-Domäne, die typischerweise regulatorische Eigenschaften für die Transkription in Form von Histon-Methylierungen übernimmt. Diese Domäne wurde in den *Drosophila* Proteinen **Suppressor of variegation** (Su(var) 3-9, Heterochromatin-assoziiertes Protein), **Enhancer of zeste** (E(z), Mitglied der Polycomb-Familie) und **Trithorax** gefunden und hat daher die

Bezeichnung SET-Domäne erhalten (Jones and Gelbart, 1993; Mazo *et al.*, 1990; Tschiersch *et al.*, 1994). Die Proteine Su(var) 3-9 und E(z) sind in ihrer Funktion als Heterochromatin-assoziiertes Protein bzw. als Mitglied der Polycomb-Proteinfamilie an der Repression von Genen beteiligt. Das gleichzeitige Aufkommen einer SET-Domäne in reprimierenden und aktivierenden Proteinen zeigt, dass selbige ausschließlich eine regulatorische Funktion in Form der Histon-Methylierung übernimmt. Die tatsächlichen Substrate, und damit die Ausprägung des regulatorischen Effekts auf die Expression, werden jedoch durch das jeweilige Gesamtprotein bestimmt. Für das MLL Protein im Speziellen konnte eine Methyltransferase-Aktivität nachgewiesen werden, als dessen Substrat der Lysin-Rest 4 (K4) des Histons H3 identifiziert wurde und die dementsprechend positive Auswirkungen auf die Genexpression hat (siehe Abschnitt *Bildung des MLL Multiprotein-Superkomplexes*) (Milne *et al.*, 2002; Nakamura *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu konnte als Substrat der *SUV39h1*-zugehörigen SET-Domäne (humanes Homolog von Su(var)3-9) der Lysin-Rest 9 des Histons H3 nachgewiesen werden, dessen Methylierung zur Repression von Genen beiträgt (Rea *et al.*, 2000).

Neben der SET-Domäne konnten noch weitere homologe Bereiche in den Proteinen MLL und Trithorax identifiziert werden. Es handelt sich um Cystein-/Histidin-reiche Regionen, die für die Ausbildung von Zink-Fingern typisch sind (Tkachuk *et al.*, 1992). Im Falle von MLL bzw. Trithorax bilden diese Bereiche allerdings keine typischen Zink-Finger aus, welche eine DNA-Bindung vermitteln würden. Die spezielle Anordnung der Aminosäure-Reste führt zur Ausbildung von 4 sogenannten PHD-Fingern (**P**lant **H**omeo **D**omain), die spezifische Protein-Proteininteraktionen vermitteln können. Neben einer Homodimerisierung der PHD-Finger untereinander, konnte eine Interaktion des PHD-Finger 3 mit dem nukleären Cyclophilin Cyp33 gezeigt werden (Fair *et al.*, 2001). Diese Interaktion verstärkt die Rekrutierung von Histon-Deacetylasen an die Repressionsdomäne des MLL Proteins (Xia *et al.*, 2003). Untersuchungen der mRNA-Level verschiedener Zielgene des MLL Proteins (*HOXC8*, *HOXC9* und *HOXC6*) in Anwesenheit oder Abwesenheit von Cyp33, belegen eine Modulation der Genexpression durch diese Interaktion. Interessanterweise konnten kürzlich zwei Arbeitsgruppen zeigen, dass die Integration des dritten PHD-Fingers in verschiedene MLL Fusionsproteine (MLL/AF9 bzw. MLL/ENL) die onkogene Transformation von Zellen blockiert (Chen *et al.*, 2008; Muntean *et al.*, 2008). In diesen Studien wurde nachgewiesen, dass die beschriebene Modifikation zur Bindung von Cyp33 an die Fusionsproteine führt, wodurch die erhöhte Expression von *HOX* Genen unterbunden wird. Diese wird typischerweise durch Fusionsproteine von *MLL* Translokationen hervorgerufen. Generell konnten für PHD-Finger anderer Proteine weitere Funktionen beschrieben werden,

jedoch wurden diese bis heute nicht für die PHD-Finger des MLL Proteins bestätigt. Hier sei als Beispiel der PHD-Finger des ING2 Proteins genannt, für den neben einer Interaktion mit nukleären Phosphatidylinositol-Phosphaten zusätzlich eine spezifische Bindung an trimethyliertes H3K4 nachgewiesen werden konnte (Gozani *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2006). Die Erkennung dieser spezifischen Histonmodifikation H3K4 wurde auch für andere PHD-Finger gezeigt (Wysocka *et al.*, 2006). Durch die beschriebenen Wechselwirkungen der PHD-Finger können sie unterschiedliche regulatorische Funktionen übernehmen.

Zwischen dem dritten und dem vierten PHD-Finger befindet sich die konservierte Bromodomäne, welche eine Bindung des MLL Proteins an acetylierte Lysin-Reste von Histonen vermittelt (Dhalluin *et al.*, 1999; Jeanmougin *et al.*, 1997). Diese Bindung ermöglicht einen Synergismus verschiedener aktivierender Histonmodifikationen.

Die Transaktivierungsdomäne (TAD) innerhalb der C-terminalen Hälfte des MLL Proteins übernimmt ebenfalls eine regulatorische Rolle (Prasad *et al.*, 1995). Ihre transaktivierenden Eigenschaften sind von der Interaktion mit dem **CREB-Binding Protein** CBP abhängig (CREB = **C**yclic AMP **R**esponse **E**lement-**B**inding Protein). Bei CBP handelt es sich gleichzeitig um eine Histon-Deacetylase und einen nukleären Co-Aktivatoren. Durch die Interaktion von TAD mit CBP wird die Bindung von CBP an phosphoryliertes CREB Protein erleichtert und somit begünstigt. Die Ausbildung dieses Dreier-Komplexes macht eine synergistische Wirkung von MLL und CREB auf bestimmte Zielgene möglich (Ernst *et al.*, 2001).

Verschiedene Domänen, die eine Bindung des MLL Proteins an die DNA ermöglichen, finden sich im N-terminalen Anteil des Proteins. Durch das Vorhandensein von drei AT-Haken wird eine unspezifische Bindung an AT-reiche Bereiche in der kleinen Furche der DNA vermittelt (Tkachuk *et al.*, 1992; Zeleznik-Le *et al.*, 1994). Die **Methyltransferase-Homologie-Domäne** (MT-Domäne) dient der Unterscheidung von methylierten und unmethylierten CpG-Dinukleotiden in der DNA (Ma *et al.*, 1993). Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Bindung des MLL Proteins ausschließlich an unmethylierte DNA stattfindet (Birke *et al.*, 2002). Die Bezeichnung MT-Domäne beruht auf der hohen Homologie zur regulatorischen, Cystein-reichen Domäne der **DNA-Methyltransferase 1** (DNMT 1). Möglicherweise wird durch die Fähigkeit, zwischen aktiven und inaktiven DNA-Abschnitten zu unterscheiden, eine weitere Regulationsstufe der Genexpression durch das MLL Protein erreicht.

In Transkriptions-Aktivierungsversuchen konnte einem Bereich, welcher die MT-Domäne überspannt, eine reprimierende Wirkung zugeschrieben werden. Der entsprechende Bereich wird auch als Repressionsdomäne bezeichnet (Prasad *et al.*, 1995; Zeleznik-Le

et al., 1994). Die reprimierenden Eigenschaften werden durch die Interaktion mit verschiedenen Proteinen vermittelt. Die Bindung der **Histon-Deacetylasen** HDAC1 und HDAC2 ist beispielsweise für die Effekte nachgewiesenermaßen mitverantwortlich. Durch die beschriebene Bindung von Cyp33 an den benachbarten PHD-Finger wird diese Wechselwirkung verstärkt. Zusätzlich konnte eine Interaktion der Repressionsdomäne mit den zwei Polycomb-Proteinen HPC2 und BMI-1, sowie mit dem Co-Repressor CtBP nachgewiesen werden. Auch diese Interaktionen sind für die reprimierende Wirkung der Repressionsdomäne bedeutend (Xia *et al.*, 2003). Zwischen den AT-Haken und der MT-Domäne befinden sich zwei nukleäre Lokalisationssequenzen SNL I und SNL II (**S**peckled **N**uclear **L**ocalization), welche eine distinkte Lokalisation des MLL Proteins innerhalb des Zellkerns bewirken (Yano *et al.*, 1997).

Bildung des MLL Multiprotein-Superkomplexes

Damit das Protein seine volle Funktionsfähigkeit erreicht, muss es an zwei spezifischen Schnittstellen CS I und CS II (**C**leavage **S**ite I und II) mit der Konsensussequenz QXD/G^ADD (X = hydrophile Aminosäure) geschnitten werden (siehe Abbildung 2-4) (Hsieh *et al.*, 2003b; Yokoyama *et al.*, 2002). Die Prozessierung erfolgt durch die Threonin-Aspartase Taspase I und resultiert in der Bildung zweier Protein-Fragmente MLL_N und MLL_C mit einer Größe von etwa 300 bzw. 180 kDa (berechnete Größe ca. 130 kDa, Laufverhalten im Polyacrylamid-Gel entspricht aber einer Größe von 180 kDa) (Hsieh *et al.*, 2003a; Yokoyama *et al.*, 2002). Im Anschluss an die Prozessierung erfolgt eine Komplexbildung der beiden Fragmente und die Phosphorylierung des Fragments MLL_C (Yokoyama *et al.*, 2002). Es wurden 2 Domänen beschrieben, FYRN (Phenylalanin-Tyrosin-reiche Region in MLL_N) und FYRC (Phenylalanin-Tyrosin-reiche Region in MLL_C), welche an der Assemblierung der Fragmente MLL_N und MLL_C mitbeteiligt sind (vgl. Abschnitt 2.5.6 Intramolekulare Proteininteraktion des MLL Proteins).

Es konnte nachgewiesen werden, dass MLL_C den entstehenden Komplex stabilisiert und den Abbau von MLL_N verhindert. Letzteres hingegen verleiht dem Komplex durch die erwähnten Lokalisationssequenzen eine nukleäre Lokalisation (Hsieh *et al.*, 2003a). Hat das MLL Protein einmal diesen Komplex gebildet, dient dieser als Plattform für einen Multiprotein-Superkomplex, welcher letztlich alle Funktionen des MLL Proteins vermittelt.

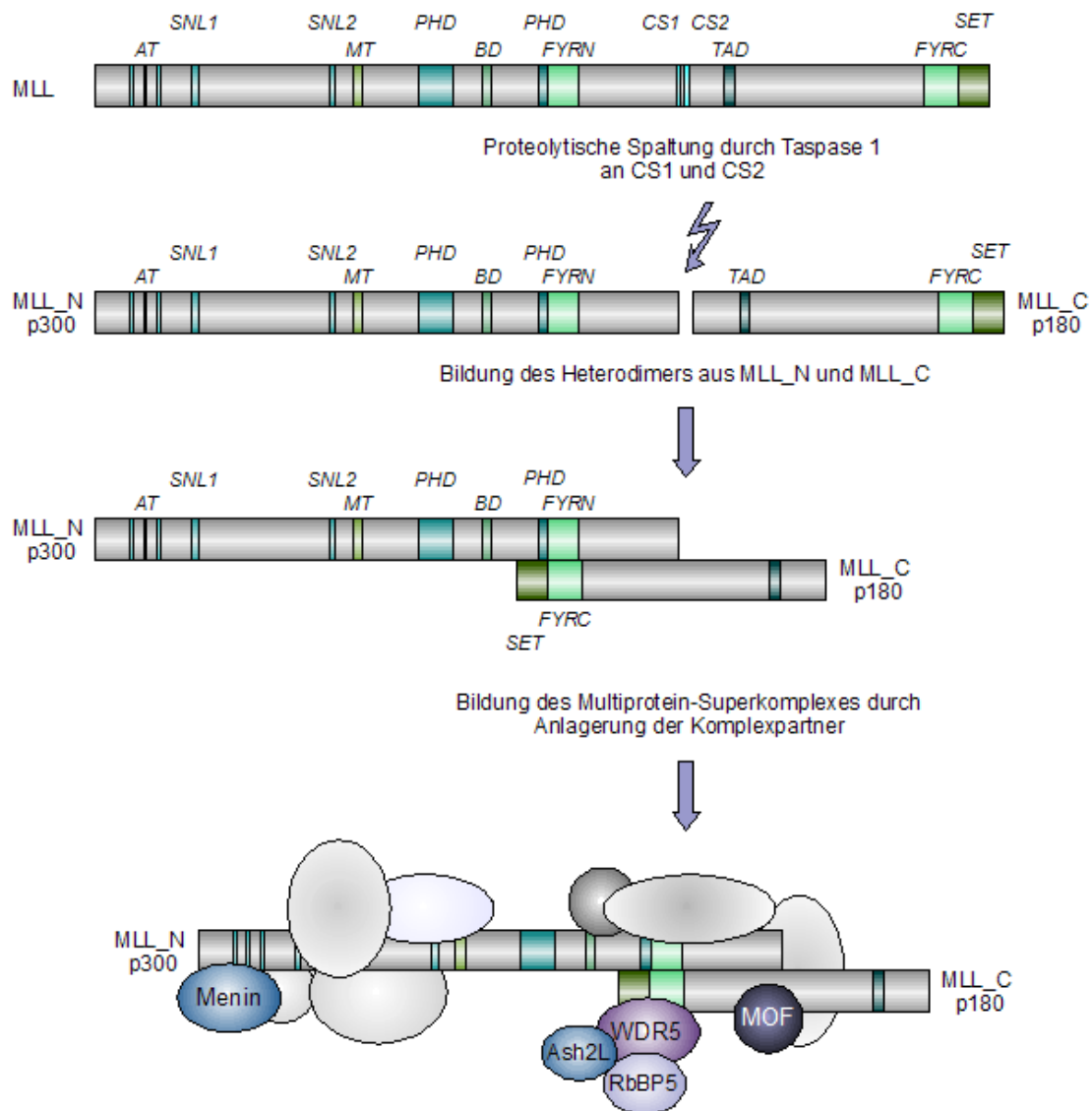


Abbildung 2-4: Prozessierung des nativen MLL Proteins. Die Protease Taspase 1 schneidet das Protein an zwei spezifischen Schnittstellen unter einem Verlust von 52 Aminosäuren. Die 2 resultierenden Fragmente assoziieren und ermöglichen die Anlagerung von weiteren Proteinen unter Bildung des MLL Multiprotein-Superkomplexes.

Über die genaue Zusammensetzung des Komplexes existieren verschiedene Publikationen, die sehr unterschiedliche Komplexpartner beschreiben. Im Jahr 2002 wurde erstmals von Nakamura *et al.* ein Komplex veröffentlicht, der sich aus mindestens 27 verschiedenen Proteinen aufbaut (Nakamura *et al.*, 2002). Zu diesem Komplex gehören Komponenten des SWI/SNF Komplexes, unter anderem BRM und INI, die für Chromatin-Remodellierungsprozesse (aktivierend oder inaktivierend) verantwortlich sind. Die Interaktion der SET-Domäne von MLL mit dem INI Protein wurde bereits früher in

unabhängigen Versuchen gezeigt (Rozenblatt-Rosen *et al.*, 1998). Die reprimierenden Komplexe NuRD und Sin3A sind durch verschiedene Komponenten, beispielsweise Mi-2, HDAC1 und 2, in dem Superkomplex vertreten. Des Weiteren beschreiben Nakamura *et al.* das Vorhandensein von Bestandteilen des TFIID Komplexes. Bei beginnender Assemblierung des Präinitiationskomplexes vermitteln diese eine Bindung an die Promotor-Box. Ebenfalls wurden Faktoren identifiziert, welche für die RNA-Prozessierung nötig sind und zum Präinitiationskomplex rekrutiert werden. Alle genannten Proteine konnten bei der späteren Beschreibung des zweiten MLL Komplexes nicht gefunden werden (Yokoyama *et al.*, 2004). Dieser zweite Komplex ist deutlich kleiner (ca. 1 MDa im Gegensatz zu mehreren MDa) und setzt sich aus nur 7 Komponenten (inkl. MLL) zusammen. Die einzigen Proteine, die in beiden Komplexen vorhanden sind, sind zwei WD40-repeat Proteine, WDR5 und RbBP5. Diese, bzw. ihre homologen Vertreter in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, sind für die H3K4-Methyltransferase Aktivität des Hefe-Set1 Komplex (ySet1) unerlässlich (Nagy *et al.*, 2002). Neben diesen beiden Proteinen konnte noch eine weitere Komponente aus dem ySet1 Komplex (bzw. deren Homolog), in dem MLL Komplex gefunden werden. Ash2L, welches wie auch MLL zur Familie der Trithorax-Proteine gehört, bildet zusammen mit WDR5 und RbBP5 einen Komplex, der im Ganzen an die SET-Domäne des MLL Proteins bindet. Dieser sogenannte HMT-Subkomplex (**H**iston-**M**ethyltransferase), bestehend aus SET-Domäne, WDR5, RbBP5 und Ash2L ist in der Lage, Methylierungen (Mono-, Di- und Tri-Methylierungen) von H3K4 durchzuführen (Dou *et al.*, 2006). WDR5 vermittelt eine Bindung an H3K4 und bringt den Lysin-Rest in eine exponierte Form; eine Konformation die eine weitere Modifikation begünstigt. Die Assoziation von WDR5 mit H3K4 ist am stärksten, wenn selbiges dimethyliert vorliegt (Han *et al.*, 2006; Ruthenburg *et al.*, 2006; Wysocka *et al.*, 2005). Somit ist WDR5 für die Erzeugung von räumlicher Nähe zwischen Enzym (HMT-Subkomplex) und Substrat (H3K4) zuständig. Fehlt WDR5 in dem Subkomplex, geht, zumindest *in vitro*, dessen gesamte Methyltransferase Aktivität verloren. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigten *knock-down* Studien des WDR5 Proteins eine Reduktion des Gesamt-Methylierungslevels von H3K4 auf. Die Expression der *Hox* Gene *HoxC8* und *HoxA9* war stark vermindert, obgleich MLL weiterhin mit den entsprechenden Loci assoziiert war (Wysocka *et al.*, 2005). WDR5 ist folglich sowohl für die Erkennung, als auch für die Etablierung des H3K4-Methylierungsstatus verantwortlich (Dou *et al.*, 2006). Versuche mit dem ySet1 Komplex brachten die Erkenntnis, dass eine Mono-Ubiquitinylierung von Histon 2B für H3K4 Methylierungen Voraussetzung ist (Sun and Allis, 2002). Die initiale Monomethylierung kann auch in Abwesenheit der genannten Ubiquitinylierung stattfinden, die Transition zu

nachfolgenden Methylierungsstufen ist in diesem Zustand jedoch nicht möglich (Shahbazian *et al.*, 2005). In anschließenden Studien erfolgte ein Nachweis für entsprechende Regulationsmechanismen über abgestimmte Histonmodifikationen in humanen Zellen (Zhu *et al.*, 2005).

Ein weiterer Bestandteil des von Yokoyama *et al.* publizierten Komplexes ist das Protein Menin, das Produkt des Tumorsuppressor-Gens *MEN-1* (***Multiple Endocrine Neoplasia type-1***), welches häufig in Neoplasien endokriner Organe mutiert ist (*loss of function* Mutation) (Chandrasekharappa *et al.*, 1997). Menin tritt über eine Interaktion mit dem N-Terminus des MLL Proteins (AS 5-44) in den Komplex ein und ist in die Rekrutierung desselben an transkriptionelle Targets involviert (Caslini *et al.*, 2007; Milne *et al.*, 2005b). Zusammen sind Menin und MLL an der Expressionsregulation von *Hox* Genen und *CDK-Inhibitor* Genen (***Cyclin Dependant Kinase***) beteiligt (Hughes *et al.*, 2004; Milne *et al.*, 2005b; Yokoyama *et al.*, 2004). Dementsprechend führt der Einsatz von siRNAs (*small interfering RNA*) gegen MLL oder Menin zu einer vergleichbaren Reduktion der *HoxA9* Expression (Yokoyama *et al.*, 2004). In Abwesenheit des Menin Proteins werden die Effekte des MLL Fusionsproteins auf die *Hox* Expression aufgehoben (Yokoyama *et al.*, 2005). Eine weitere Interaktion des Menins besteht mit dem phosphorylierten Serin 5 der C-terminalen-Domäne CTD der RNA-Polymerase II, wodurch eine Verbindung zwischen dem MLL Protein und der aktiven Transkription hergestellt wird (Hughes *et al.*, 2004). An dieser Stelle sei erwähnt, dass in späteren Analysen auch eine direkte Interaktion des MLL Proteins mit der CTD der RNA Polymerase II nachgewiesen wurde (Milne *et al.*, 2005a).

Bei den zwei übrigen Komponenten des Komplexes handelt es sich um die transkriptionellen Co-Regulatoren HCF-1 und HCF-2 (***Host Cell Factor***), welche durch Bindung ihrer Kelch-Domäne an das HCF-Bindungsmotiv innerhalb des MLL Proteins in den Komplex eintreten (Freiman and Herr, 1997; Wysocka *et al.*, 2001). In unabhängigen Studien wurde eine Interaktion von HCF-1 mit dem Sin3A Komplex nachgewiesen, der von Yokoyama *et al.* jedoch nicht im MLL Komplex identifiziert werden konnte (Wysocka *et al.*, 2003). Dies ist möglicherweise damit zu begründen, dass in der verwendeten Zelllinie der Anteil an MLL-gebundenem HCF-2 im Vergleich zu HCF-1 deutlich höher war, und HCF-2 nicht in der Lage ist, an den Sin3A Komplex zu binden. Eventuell würde man mit einer anderen Zelllinie für diesen speziellen Fall ein anderes Ergebnis erhalten. Generell ist die Verwendung unterschiedlicher Versuchsmethoden eine mögliche Ursache für die großen Unterschiede der beiden publizierten MLL Komplexe.

In einer späteren Studie erlangte der zweite Komplex annähernd Bestätigung, wurde aber zusätzlich um die Histon-Acetyltransferase MOF erweitert (Dou *et al.*, 2005). Es konnte eine direkte Interaktion der Zink-Finger von MOF mit einer C-terminalen Region von MLL nachgewiesen werden. Auf diese Weise erlangt der Komplex zusätzlich zur H3K4 Methyltransferase Aktivität eine H4K16 spezifische Acetyltransferase Aktivität. Letztere ist jedoch direkt von der Anwesenheit des MLL Proteins abhängig. Analog zu den Ergebnissen beim WDR5 Protein führt auch der *knock-down* von MOF zu einer stark verminderten *HoxA9* Expression, welche mit einer signifikanten Reduktion der H4K16 Acetylierung begründet werden kann. Methylierung und Acetylierung wirken additiv, dass heißt sie verstärken gegenseitig die Aktivierung der Genexpression.

AF4 Protein

Ausgehend von dem 10,5 kb Transkript des *AF4* Gens wird das AF4 Protein mit einer Größe von 1.211 bzw. 1.218 AS und einem Molekulargewicht von etwa 130 kDa gebildet. Nach den bisherigen Untersuchungen wird es ubiquitär exprimiert, obgleich die Expression in placentarem Gewebe, im Hippocampus, dem Thymus sowie in der Schilddrüse vergleichsweise hoch ist (Chen *et al.*, 1993a; Frestedt *et al.*, 1996). Aufgrund hoher Gemeinsamkeiten bezüglich des Aufbaus und der Sequenz mit den Proteinen LAF4 und FMR2 wurden diese 3 Proteine zur ALF-Familie (**AF4**, **LAF4**, **FMR2**) zusammengefasst (Gu *et al.*, 1996; Ma and Staudt, 1996; Nilson *et al.*, 1997). Inzwischen wurde die ALF-Familie um ein weiteres Mitglied, das AF5q31 bzw. MCEF Protein, erweitert (Estable *et al.*, 2002; Taki *et al.*, 1999). Neben dem *AF4* Gen wurden auch *LAF4* und *AF5q31* in Translokationen mit dem *MLL* Gen gefunden (Taki *et al.*, 1999; von Bergh *et al.*, 2002). Das Charakteristikum dieser Protein-Familie ist das Vorhandensein von 5 konservierten Domänen (Abbildung 2-5).

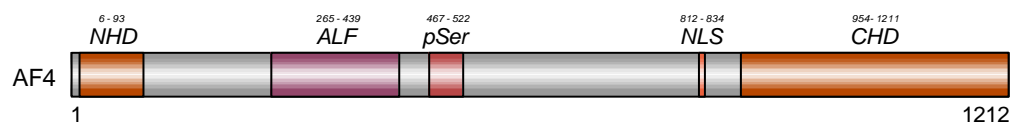


Abbildung 2-5: Aufbau des AF4 Proteins. Die Aminosäure-Positionen der 5 konservierten Domänen der ALF-Familie sind angegeben. Die Gesamtlänge des Proteins beträgt 1212 Aminosäuren.

Der erste homologe Bereich liegt direkt am Beginn der Proteine und wurde dementsprechend als **N-terminale Homologie-Domäne** NHD bezeichnet. Analog hierzu weist auch das Carboxy-terminale Ende einen homologen Bereich auf, der die

Bezeichnung CHD für **C**-terminale **H**omologie-**D**omäne erhielt. Auf die NHD folgt der am stärksten konservierte Abschnitt der Proteine, welcher in Anlehnung an den Namen ALF-Familie, als ALF-Domäne deklariert wurde. Über eine Länge von etwa 175 AS besteht eine Identität der Proteine von bis zu 86% (gilt für AF4 und LAF4; 76% zwischen AF4 und FMR2). Daher kann man davon ausgehen, dass dieser Bereich den Proteinen eine spezifische Funktion vermittelt. In unserer Arbeitsgruppe konnte für die ALF-Domäne des AF4 Proteins eine Interaktion mit den E3-Ligasen SIAH 1 und 2 nachgewiesen werden (Bursen *et al.*, 2004). Diese Wechselwirkung vermittelt eine Poly-Ubiquitinierung des AF4 Proteins, welches im Anschluss dem proteasomalen Abbau zugeführt wird. Auf diese Weise wird eine strikte Kontrolle des Proteinlevels erreicht. Weitere mögliche Funktionen der ALF-Domäne bleiben bis heute noch unbekannt. Für die vierte konservierte Domäne, einen Prolin-Serin-reichen Abschnitt von ca. 55 AS mit der Bezeichnung pSer (**p**oly-**S**erin) zeigten entsprechende Versuche ein recht starkes transaktivierendes Potential (Morrissey *et al.*, 1997). Eine distinkte Verteilung innerhalb von Zellen vermittelt die letzte konservierte Domäne, bei der es sich um eine nukleäre Lokalisationssequenz NLS handelt.

2.5.4 Funktionen der Wildtyp Proteine MLL und AF4

MLL Protein

Durch die recht hohe Homologie zum Trithorax Protein aus *Drosophila* lag die Vermutung nahe, dass auch bezüglich der Funktion Gemeinsamkeiten zu finden sind. Das Trithorax Protein, Namensgeber der Trithorax-Familie, reguliert die Expression wichtiger Gene während der Embryonalentwicklung. Aufgrund eines spezifischen DNA-Bindemotivs, der Homeobox bzw. Homeodomäne, tragen die regulierten Gene die Bezeichnung der *HOX* Gene (ursprünglich bei Invertebraten auch *HOM* Gene). Die Regulation durch Mitglieder der Trithorax Proteinfamilie erfolgt in der Form, dass sie die aktive Transkription von Genen fördern. Durch die geregelte Expression der *HOX* Gene wird eine präzise Einhaltung des Körperbauplans gewährleistet, der eine exakte Segmentierung gewährleistet. Hierfür ist neben der positiven Stimulierung der Genexpression in bestimmten Bereichen des Embryos die gleichzeitige Repression der Gene in anderen Körperabschnitten unerlässlich. Die reprimierende Funktion übernehmen die Proteine der Polycomb-Gruppe, die dementsprechend als eine Art Gegenspieler zu den Proteinen der Trithorax-Gruppe fungieren.

Um eine mögliche Beteiligung des MLL Proteins an der Embryonalentwicklung aufzuklären, wurden verschiedene Mausmodelle entwickelt. Ein homozygoter *Mill* knock-out

(*Mll*^{-/-}) in Mausembryonen, welcher durch Insertion einer *LacZ*-Reporterkassette in das Exon 4 des *Mll* Gens in murinen embryonalen Stammzellen hervorgerufen wurde, wirkte sich bereits am Tag 10,5 der Entwicklung letal aus (Yu *et al.*, 1995). Heterozygote Embryonen mit einem defekten und einem intakten *Mll* Allel (*Mll*^{+/-}) waren lebensfähig, zeigten jedoch starke Skelettdeformationen, ein vermindertes Wachstum und Störungen in der Hämatopoiese. Untersuchungen der Mausembryonen zeigten in heterozygoten Mäusen eine Verschiebung des Expressionsmusters der Gene *Hoxa7* und *Hoxc9*, während die Expression in homozygoten *Mll* knock-out Mäusen völlig fehlte. Durch Vergleich der Expressionsmuster von *Mll*^{-/-} und *Mll*^{+/-} Mausembryonen zu verschiedenen Zeitpunkten konnte dieselbe Arbeitsgruppe später belegen, dass das Mll Protein zwar nicht für die Initiation, aber für die Aufrechterhaltung der *Hox* Genexpression unabdingbar ist und entsprechend einen wichtigen Einfluss auf die Embryonalentwicklung hat (Yu *et al.*, 1998).

Störungen der Hämatopoiese bei heterozygoten *Mll* knock-out Mäusen ließen vermuten, dass dieser Effekt ebenfalls durch die induzierte gestörte *Hox* Genexpression bedingt wird. Neben ihrer Funktion in der Erzeugung einer korrekten Segmentierung des Körperbaus, spielen die *Hox* Gene tatsächlich auch bei der Hämatopoiese eine Rolle. Korrekte, spezifische Expressionsmuster dieser Gene sind für spezielle Differenzierungsprozesse der hämatopoietischen Zellen verantwortlich (Look, 1997). Die Analyse der Mll Expression zeigte ein Aufkommen des Proteins in Organen des hämatopoietischen und lymphoiden Systems (z. B. fötale Leber, Milz, Thymus), so dass es auch in diesen Geweben zu einer missregulierten *Hox* Expression kommt (Butler *et al.*, 1997). *Mll*^{-/-} Embryonen zeigten Fehler in der Ausbildung verschiedener Blutzellen, die jedoch abhängig vom Zelltyp in ihrer Schwere variierten (Hess *et al.*, 1997). Genauere Untersuchungen bezüglich der Rolle des Mll Proteins zeigten, dass Mll essentiell für die Hämatopoiese ist, und dass das Fehlen des Mll Proteins die Ausbildung von hämatopoietischen Stammzellen vollständig verhindert. Auch eine Reduktion im Proteinlevel weist bereits solche Auswirkungen auf (Ernst *et al.*, 2004). Es ist möglich, dass diese gravierenden Auswirkungen nicht allein auf die Deregulation der *Hox* Gene zurückzuführen ist, sondern hier weitere Zielgene des Mll Proteins eine Rolle spielen. Die Tatsache, dass in leukämischen Zellen mit einer *MLL* Translokation typischerweise eine Überexpression der *HOX* Gene und des Co-Faktors *MEIS1* beobachtet werden kann, spricht sehr stark für eine Beteiligung der *HOX* Gene an der gestörten Hämatopoiese.

Spezifische Analysen zur Aufklärung des Mechanismus der Expressionsregulation durch das MLL Protein zeigten eine direkte Bindung des Proteins an die Promotor-Sequenzen

der regulierten Gene (*HoxA9* und *HoxC8*) (Milne *et al.*, 2002). In Abwesenheit des MLL Proteins wurde an den entsprechenden Promotoren eine veränderte H3K4 Methylierung nachgewiesen, die durch Reexpression von MLL wiederhergestellt werden konnte. Die H3K4 Methyltransferase Aktivität konnte eindeutig der SET-Domäne des MLL Proteins zugeschrieben werden. Mäuse, welche eine verkürzte Form des Mll Proteins ohne SET-Domäne exprimieren, zeigen eine dramatische Reduktion in der H3K4 Methylierung sowie, daraus folgend, Defekte bei der DNA Methylierung (Terranova *et al.*, 2006). Histonmodifikationen spielen eine zentrale Rolle in der epigenetischen Programmierung, so dass eine entsprechende Aufgabe für das Mll Protein höchst wahrscheinlich ist. Auch die antagonistischen Effekte des Mll Proteins als Mitglied der Trithorax-Familie und des Bmi-1 Proteins als Mitglied der Polycomb-Gruppe, legen eine epigenetische Funktion nahe. Die entgegengesetzten Eigenschaften dieser beiden Proteine konnten in Versuchen eindrucksvoll bestätigt werden, bei denen *Mll^{+/-}* Mäuse mit *Bmi-1^{+/-}* Mäusen gekreuzt wurden. Bei Kreuzung der beiden heterozygoten Mäuse heben sich die fehlerhaften Effekte auf die *Hox* Genexpression gegenseitig auf (Hanson *et al.*, 1999). Eine weitere wichtige Funktion des Mll Proteins wurde kürzlich aufgedeckt, als die Auswirkungen eines Taspase1 *knock-out* in Mäusen untersucht wurden (Takeda *et al.*, 2006). Ein solcher *knock-out* hat zur Folge, dass keine Prozessierung des Mll Proteins mehr stattfinden kann. Die Mäuse zeigten neben leichten Skelettdeformationen ein deutlich vermindertes Wachstum, eine Fehlbindung, welche häufig durch eine Störung der Zellzyklus Regulation hervorgerufen wird. Analysen von entsprechenden Genloci zeigten eine direkte Regulation der Cycline A, B und E, welche durch Interaktion des Mll Proteins mit verschiedenen E2Fs verursacht wird. Zuvor zeigten bereits Dou *et al.* bei ihrer Aufreinigung des MLL Komplexes eine Interaktion mit E2F6 (Dou *et al.*, 2005). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass das MLL Protein über eine Regulation der Cycline maßgeblich an der Steuerung des Zellzyklus beteiligt ist. ChIP Analysen belegen eine Beteiligung des MLL Proteins an der Regulation weiterer Gene, so dass durchaus noch weitere essentielle Funktionen für das Protein vorstellbar sind (Milne *et al.*, 2005a). Interessanterweise zeigt sich für das MLL Protein sehr häufig eine Co-Lokalisation mit aktiver RNA Polymerase II an aktiven Genloci; eine Erkenntnis, die eine Funktion bei der transkriptionellen Elongation vermuten lässt.

AF4 Protein

Erste Untersuchungen zur Funktion des AF4 Proteins legten transaktivierende Eigenschaften und eine nukleäre Lokalisation offen, was eine Funktion als Transkriptionsfaktor vermuten ließ (Morrissey *et al.*, 1997; Prasad *et al.*, 1995).

Funktionelle Studien des Proteins in Form eines *Af4 knock-out* Mausmodells erwiesen eine Beteiligung des Af4 Proteins an der lymphoiden Entwicklung (Isnard *et al.*, 2000). Die generierten homozygoten *Af4*^{-/-} Mäuse waren lebensfähig, zeigten aber deutliche Veränderungen in der Lymphopoiese. Aufgrund einer relativ hohen Expression des *Af4* Gens in plazentarem Gewebe wurde vermutet, Af4 könne eine entscheidende Funktion bei der Entwicklung einnehmen (Frestedt *et al.*, 1996). Die lebensfähigen *Af4*^{-/-} Mäuse relativierten die Tragweite der Af4-vermittelten Auswirkungen. Die Anzahl der doppelt-positiven CD4⁺/CD8⁺ Thymocyten, wie auch die Menge reifer B-Lymphocyten war in den betroffenen Tieren deutlich herabgesetzt. Als mutmaßliche Ursache wurde die verminderte Proliferation der zugehörigen unreifen Vorläuferzellen beschrieben. Interessanterweise sind von einem Fehlen des Af4 Proteins ausschließlich die lymphoiden Zellen des hämatopoietischen Systems betroffen, während die Zellen des myeloischen Zweigs unbeeinflusst bleiben. Möglicherweise liegt die Spezifizierung einer t(4;11)-positiven Leukämie in die akute lymphatische Form zumindest teilweise hierin begründet.

Andere Studien legten eine Rolle des AF4 Proteins im Zentralnervensystem offen (Isaacs *et al.*, 2003). Eine Mutation in einem hoch konservierten Bereich innerhalb des *Af4* Gens konnte als Ursache für den Phänotyp der „robotic mouse“ identifiziert werden. Für diese Mäuse sind stark eingeschränkte motorische Fähigkeiten typisch, welche durch sehr mechanische, ruckartige Bewegungsabläufe deutlich werden. Verursacht wird dies durch den Verlust der Purkinje-Zellen im Kleinhirn, der ab der 8. Lebenswoche deutlich zu erkennen ist. Des Weiteren sind die Mäuse deutlich kleiner als gesunde Tiere und leiden häufig an grauem Star. Die genannte Mutation liegt innerhalb der ALF-Domäne im *Af4* Gen und bewirkt eine Veränderung des PxAxVxP-Motivs (x = beliebige Aminosäure), welches die Erkennung des AF4 Proteins durch die E3-Ligasen SIAH 1 und 2 vermittelt. Die Mutation resultiert in einer stark verminderten Affinität zwischen den Proteinen (House *et al.*, 2003; Oliver *et al.*, 2004). Dies wiederum führt zu einem verminderten proteasomalen Abbau von Af4 und letztlich zur Ausprägung des beschriebenen Phänotyps.

Die Funktionsweise des AF4 Proteins wird durch die Interaktion mit verschiedenen anderen Proteinen geregelt. Zunächst konnte eine Interaktion mit dem AF9 Protein beschrieben werden, welches ebenfalls recht häufig in *MLL* Translokationen gefunden wird (Erfurth *et al.*, 2004). Es wurde der Nachweis erbracht, dass die Interaktion für die Proliferation der leukämischen Zellen einer t(4;11) unerlässlich ist (Srinivasan *et al.*, 2004). Etwas später wurde eine Interaktion von AF4 mit dem ENL Protein aufgedeckt, welches seinerseits wiederum mit den Proteinen AF10 und AF5q31 interagiert (Zeisig *et*

al., 2005). Schließlich ist es Bitoun *et al.* gelungen, das Zusammenspiel dieser und zusätzlicher Proteine im Maussystem aufzuklären, und somit einen wichtigen gemeinsamen Funktionsmechanismus darzulegen (Bitoun *et al.*, 2007). Bei den durchgeführten Analysen wurde festgestellt, dass Af4 mit den beiden Untereinheiten Cdk9 und Cyclin T1 von P-TEFb (**P**ositive **T**ranscription **E**longation **F**actor **b**) interagiert und es somit eine direkte Rolle an der Regulation der transkriptionellen Elongation durch die RNA Polymerase II einnimmt. Neben diesem Zusammenspiel besteht gleichzeitig eine Wechselwirkung mit den Proteinen Af9 sowie Enl. Die Bindung an P-TEFb stimuliert dessen Kinase Aktivität und führt im Folgenden zu einem Anstieg des Phosphorylierungsgrads vieler Proteine. Betroffen sind hier beispielsweise Af4 selbst, die CTD der RNA Polymerase II, sowie Af9 und Enl. Letztere werden durch die Phosphorylierung vermehrt degradiert. Bei diesen Versuchen wurde deutlich, dass die Bindung von Af9 und/oder Enl an das Af4 Protein selbiges vor dem proteasomalen Abbau schützt. Enl vermittelt zusätzlich die Bindung von Af10 an den beschriebenen Komplex, wodurch die Rekrutierung der Methyltransferase Dot1 an die elongierende RNA Polymerase II erreicht wird. Dot1 ist für die Methylierung von H3K79 verantwortlich, eine typische Markierung von aktivem Chromatin. Auf diese Weise wird ein Fortschreiten der Transkription begünstigt. Werden nun Af9 und Enl durch P-TEFb phosphoryliert und damit vermehrt degradiert, kann auch Af4 nicht mehr stabilisiert und Af10 nicht mehr rekrutiert werden. All diese Ergebnisse machen zusammen eine Rolle des Af4 Proteins als positiver Regulator der transkriptionellen Elongation deutlich, die offenbar einer Regulation über einen negativen „*feedback*“ Mechanismus in Form unterschiedlicher Phosphorylierungen unterliegt.

2.5.5 Aufbau und Funktion der Fusionsproteine und ihre Rolle bei der Leukämogenese

Die Entstehung einer Leukämie hängt neben dem Funktionsverlust der Wildtyp Proteine auch sehr stark von dem Vorkommen der zwei neu gebildeten Fusionsproteine und dem damit verbundenen Funktionsgewinn ab. Die Rolle, welche jedes einzelne Derivatprotein bei der Ausbildung einer Leukämie einnimmt, ist ein kritisches Thema. Für viele Translokationen unter Beteiligung der Bande 11q23 wurde das der11 Fusionsprotein, welches sich aus dem N-Terminus des MLLs und dem C-Terminus des Translokationspartners V (**v**ariabel) zusammensetzt, als Onkoprotein identifiziert (Birke *et al.*, 2002). Die Untersuchung eines artifiziellen Fusionsproteins, welches durch Ligation des bakteriellen *lacZ* Gens an den N-Terminus des *MLL* Gens generiert wurde, stützt die Annahme, dass im Allgemeinen das der11 Fusionsprotein für die Entstehung

der Leukämie verantwortlich ist (Dobson *et al.*, 2000). Dieses Fusionsprotein reichte aus, um in den betroffenen Mäusen eine Leukämie auszulösen. Überdies ist es nicht immer möglich, das reziproke derV Protein zu detektieren. Aufgrund entsprechender Studien kann ausgeschlossen werden, dass alleine der N-Terminus des MLL Proteins ausreicht, eine Transformation von Zellen zu erreichen (Corral *et al.*, 1996). Im Fall der Translokation vom Typ t(4;11) scheinen beide Fusionsproteine eine wichtige Rolle bei der Leukämie-Entstehung einzunehmen, auch wenn unklar ist, weshalb trotzdem nicht bei allen Patienten das der4 Fusionsprotein AF4/MLL detektiert werden kann (Domer *et al.*, 1993). Kürzlich ist es gelungen, bei Patienten mit scheinbar fehlendem der4 Protein komplexe Rearrangements wie beispielsweise Drei-Wege-Translokationen aufzudecken (Kowarz *et al.*, 2007). Solche komplexen Aberrationen können das Fehlen eines der4 Proteins erklären. Im Folgenden werden die beiden Derivat-Proteine und ihre bisher bekannten Funktionen beschrieben.

Die Größen und der genaue Aufbau der Fusionsproteine hängen selbstverständlich von der Position der zugrundeliegenden Brüche innerhalb der Bruchpunktsregionen von *AF4* und *MLL* ab. Bei 55% der Säuglingspatienten liegen die auslösenden Brüche in Intron 11 des *MLL* Gens und Intron 3 des *AF4* Gens, während eine Fusion zwischen Intron 9 und Intron 4 von *MLL* bzw. *AF4* in weniger als 5% der Patienten in dieser Altersgruppe gefunden wird (van Dongen *et al.*, 1999). Grundsätzlich kann man festhalten, dass das Fusionsprotein MLL/AF4 (der11) mit einer ungefähren Länge von 2100 - 2400 AS und einem Molekulargewicht von etwa 230-260 kDa das kleinere der beiden Fusionsproteine ist. Es setzt sich aus einem N-terminalen Anteil des MLL Proteins und einem C-terminalen Anteil des AF4 Proteins zusammen, welche den vorderen bzw. hinteren Bereich des Fusionsproteins bilden. Dementsprechend verfügt das der11 Fusionsprotein in seinem N-Terminus über die AT-Haken, die subnukleären Lokalisationssequenzen SNL1 und SNL2 sowie die MT-Domäne des MLL Proteins, während der C-Terminus einen Teil der ALF-Domäne, pSer, die NLS und die CHD von AF4 enthält (siehe Abbildung 2-6).

Das reziproke Fusionsprotein AF4/MLL (der4) weist dementsprechend eine Länge von etwa 2800 – 3200 AS und ein korrespondierendes Molekulargewicht von ca. 300-350 kDa auf. Der N-terminale Anteil stammt in diesem Fall vom AF4 Protein und enthält die NHD sowie einen Großteil der ALF-Domäne. Der C-Terminus wird vom MLL Protein beigesteuert und beinhaltet die PHD-Finger, die Bromodomäne, die Schnittstellen CS1 und CS2, die TAD, die SET-Domäne sowie die beiden internen Proteininteraktionsdomänen FYRN und FYRC (siehe Abbildung 2-6). Je nach Lage des Bruchs innerhalb der *bcr* des *MLL* Gens können Anteile der PHD-Finger 1-3 auch im der4 enthalten sein.

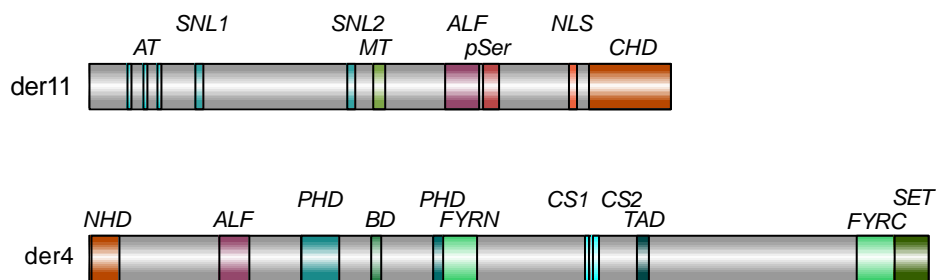


Abbildung 2-6: Aufbau der Fusionsproteine einer t(4;11). der11: MLL/AF4; der4: AF4/MLL. Anteile des MLL Proteins sind jeweils blau-grün dargestellt, Anteile des AF4 Proteins hingegen rötlich.

Wie bereits erwähnt, ist in vielen Fällen das der11 Fusionsprotein für die Entstehung einer Leukämie verantwortlich. Aus diesem Grund wurde bzw. wird auch für die Translokation des Typs t(4;11) angenommen, dass das MLL/AF4 Fusionsprotein onkogene Eigenschaften aufweist. Die Effekte dieses Proteins wurden daher in einer induzierbaren Zelllinie untersucht (Caslini *et al.*, 2004). Hierbei stellte sich heraus, dass die Zellen eine verlängerte Verdopplungszeit aufweisen und in der G1-Phase akkumulieren. Möglicherweise liegt hierin eine erhöhte Resistenz von t(4;11)-positiven Zellen gegenüber Etoposid-vermittelter Zytotoxizität begründet. Es konnte nachgewiesen werden, dass MLL/AF4, wie auch MLL, die Bildung des CDK-Inhibitors p27 über eine direkte Bindung des Promotors beeinflusst (Milne *et al.*, 2005b; Xia *et al.*, 2005). Die resultierende Überexpression von p27 in lymphoiden Zellen wurde als mögliche Ursache für die beobachteten Effekte beschrieben. Einige Zeit später wurden zwei transgene Mausmodelle des Derivat 11 Chromosoms etabliert. Die Erzeugung der transgenen Mäuse erfolgte durch Verwendung der „inverted method“ bzw. über eine *knock-in* Strategie (Chen *et al.*, 2006; Metzler *et al.*, 2006). In beiden Fällen entwickelte sich nach einer sehr langen Latenzzeit ein disseminiertes großzelliges B-Zell Lymphom mit geringer Penetranz. Nach einem Zeitraum von ≈ 530 Tagen starben ca. 50% der erkrankten Mäuse. Diese Daten zeigen deutlich, dass die entwickelten Mausmodelle nicht die tatsächliche Erkrankung widerspiegeln, welche aus einer Translokation des Typs t(4;11) resultiert. Demnach ist das MLL/AF4 Fusionsprotein alleine nicht ausreichend, um eine Leukämie mit dem typischen Phänotyp auszulösen.

Die zwei jüngsten Publikationen bezüglich der Funktion des MLL/AF4 Fusionsproteins ließen weitere interessante Einblicke in einen möglichen onkogenen Funktionsmechanismus zu. Nakamura *et al.* entdeckten eine Hochregulierung verschiedener miRNAs (microRNA) in t(4;11)-positiven Zellen (Nakamura *et al.*, 2007). Eine Co-

Immunopräzipitation erbrachte den Nachweis einer spezifischen Interaktion von MLL/AF4 mit dem Protein Drosha, welche für das native MLL Protein nicht gezeigt werden konnte. Drosha ist für einen essentiellen Schritt der miRNA Prozessierung verantwortlich. Die Interaktion mit dem Fusionsprotein steuert es vermehrt an *miRNA* Gene und führt somit vermutlich zu einer Fehlregulation des gesunden Prozesses. Da miRNAs wichtige regulatorische Funktionen in der Zelle einnehmen, wurde hier möglicherweise ein sehr wichtiger Effekt des MLL/AF4 Fusionsproteins aufgedeckt. Es sei erwähnt, dass analoge Ergebnisse für das der11 Fusionsprotein der Translokation t(9;11) erhalten wurden; eine Tatsache, welche die mögliche Relevanz dieser Erkenntnis unterstreicht.

Die Arbeitsgruppe von Croce hingegen lieferte den Beweis einer weiteren fehlgeleiteten Genexpression durch das MLL/AF4 Fusionsprotein (Nakanishi *et al.*, 2007). EphA7, eine Rezeptor-Tyrosin Kinase wird verstärkt gebildet, wenn Zellen ein *der11*-Chromosom besitzen (gezeigt für *MLL/AF4* und *MLL/AF9*). Die Deregulation erfolgt durch eine direkte Bindung des Fusionsproteins an die Promotorregion des Gens. Als Folge wurde eine vermehrte Phosphorylierung des Proteins ERK beobachtet. Der Einsatz eines Inhibitors dieser Phosphorylierung löste in den Zellen Apoptose aus, so dass man von einer Beteiligung derselben an der Ausprägung des malignen Phänotyps ausgehen kann. Möglicherweise trägt die hier entdeckte übermäßige Aktivität der Kinase zu der Apoptose Resistenz der t(4;11) Zellen bei. Aufgrund der Annahme, dass alleinig das der11 Fusionsprotein für die Leukämie verantwortlich ist, gibt es relativ wenige Untersuchungen bezüglich des AF4/MLL (der4) Fusionsproteins. In unserer Arbeitsgruppe konnte jedoch gezeigt werden, dass das AF4/MLL Fusionsprotein onkogenes Potential besitzt (Bursen *et al.*, 2004).

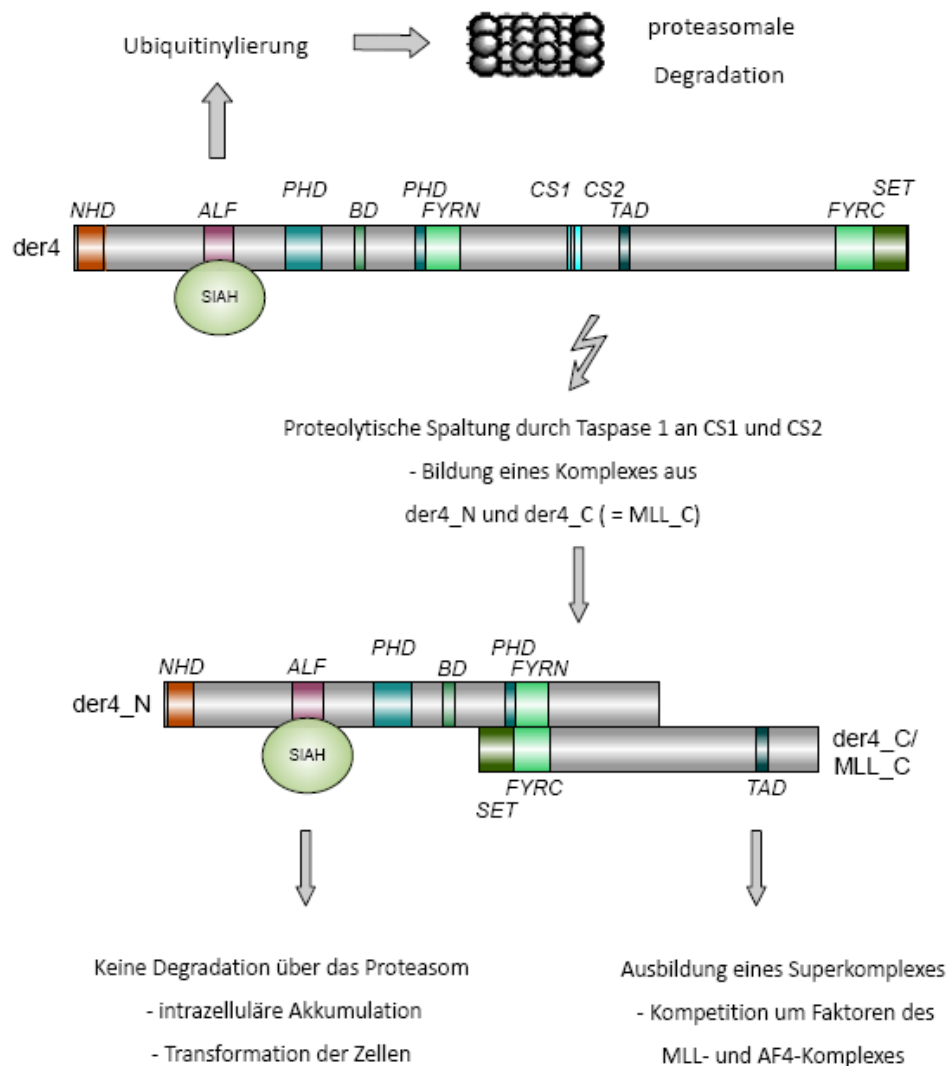


Abbildung 2-7: Pathologischer Mechanismus des der4 Fusionsproteins. Erläuterungen siehe Text.

Wie in Abbildung 2-7 veranschaulicht, verfügt das Fusionsprotein über einige, für den onkogenen Charakter des chimären Proteins essentielle Bereiche. Die partielle ALF-Domäne beinhaltet das Erkennungsmotiv für die E3-Ligase SIAH 1, die Schnittstellen CS1 und CS2 ermöglichen die Prozessierung des Fusionsproteins durch die Protease Taspase 1 und das Vorhandensein der Proteininteraktionsdomänen FYRN und FYRC erlaubt die Bildung eines Komplex aus den zwei resultierenden Fragmenten der4_N und der4_C (= MLL_C) im Anschluss an die Prozessierung. Es konnte gezeigt werden, dass das Protein sowohl in der unprozessierten als auch in der prozessierten Form von SIAH 1 erkannt und gebunden wird. Während das ungeschnittene Protein analog zum Wildtyp AF4 Protein dem proteasomalen Abbau unterzogen wird, akkumuliert der Komplex aus der4_N/MLL_C trotz SIAH Bindung in der Zelle und führt auf diesem Weg

zur Transformation. Nach der Assoziation der beiden Fragmente kommt es entsprechend der Wildtyp Situation zur Ausbildung eines Multiprotein-Superkomplexes. Neben Bestandteilen der nativen Komplexe sind hier auch noch weitere Proteine zu finden (Benedikt *et al.*, 2009). Durch die Interaktion mit dem Fusionsprotein stehen die betroffenen Proteine nicht mehr für die Wildtyp Komplexe zur Verfügung (Kompetition). Gleichmaßen werden auch die übrigen Proteine durch Bindung an die Fusionsproteine fehlgeleitet, so dass auch diese nicht mehr ihre natürliche Funktion ausüben können. Es ist nicht geklärt, weshalb der Abbau der komplexierten Proteinfragmente nicht mehr stattfindet.

Für das der11 Fusionsprotein werden analoge Auswirkungen bezüglich der Interaktion mit Faktoren der nativen Komplexe vermutet; dies konnte jedoch bisher nicht nachgewiesen werden.

Um das Zusammenspiel beider Fusionsproteine im Vergleich zu ihrer alleinigen Wirkung aufzuklären, wurden, ebenfalls in unserer Arbeitsgruppe, verschiedene stabil transfizierte murine embryonale Fibroblasten Zelllinien generiert, welche jeweils eines oder beide Fusionsproteine induzierbar exprimierten (Gaussmann *et al.*, 2007). Bei diesen Experimenten zeigte sich erneut, dass das MLL/AF4 Fusionsprotein den Zellen eine Apoptose-Resistenz verleiht. Auch das wachstumstransformierende Potential des AF4/MLL Proteins, welches sich durch den Verlust der Kontaktinhibition bemerkbar macht, konnte bestätigt werden. Die Co-Expression beider Fusionsproteine vermittelte im Vergleich die stärkste Apoptose-Resistenz, führte zum Verlust der Kontaktinhibition und verursachte eine verstärkte Proliferation der Zellen. Genexpressionsstudien der verschiedenen Zelllinien deckten sehr interessante spezifische Expressionsmuster auf. Speziell co-transfizierte Zellen regulieren die Bildung von Nanog hoch, ein Homeobox Protein, das zusammen mit den Proteinen Oct4 und Sox2 den Stammzell-Charakter, sprich die Pluripotenz und die Selbsterneuerungsaktivität von Zellen aufrecht erhält und typischerweise nicht in differenzierten Zellen zu finden ist (Chambers *et al.*, 2003; Mitsui *et al.*, 2003). Diese Besonderheit konnte auch in Biopsie-Material von Patienten bestätigt werden. Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass jedes der beiden Fusionsproteine einen gewissen Anteil zu der Ausprägung des typischen t(4;11)-assoziierten Phänotyps beiträgt, und dass sie zusätzlich einen synergistischen Effekt bewirken.

2.5.6 Intramolekulare Proteininteraktion des MLL Proteins

Bezüglich der Proteininteraktion der beiden MLL Fragmente MLL_N und MLL_C, welche nach Prozessierung des ursprünglichen Proteins entstehen, existierten von Beginn dieser Arbeit bis heute zwei Veröffentlichungen. In beiden Publikationen wurde

unabhängig voneinander die Prozessierung des MLL Proteins beschrieben und die nachfolgende Kartierung der Interaktionsdomänen erfolgte mittels Immunpräzipitation (Hsieh *et al.*, 2003b; Yokoyama *et al.*, 2002). Die publizierten Interaktionsbereiche divergieren jedoch merklich bezüglich ihrer Größe sowie der genauen Lage im Protein (siehe Abbildung 2-8). Während Yokoyama *et al.* für das MLL_N Fragment einen Bereich von 1000 AS von AS-Position 1253 – 2254 als essentiell für die Interaktion definierten, konnte der Bereich von Hsieh *et al.* auf eine Länge von nur 184 AS eingeschränkt werden, welche von AS-Position 1975 bis 2158 reichen. In beiden Fällen ist die FYRN-Region in der beschriebenen Interaktionsdomäne enthalten, die PHD-Finger als auch die Bromodomäne werden nur von Yokoyama *et al.* als wichtig befunden. Für das MLL_C Fragment wurde von Hsieh *et al.* ein minimaler Interaktionsbereich von 314 AS definiert, der sowohl die FYRC-Region als auch die SET-Domäne umfasst. Wenngleich der für den N-Terminus identifizierte Bereich von Yokoyama *et al.* deutlich größer war, so ergaben dessen Versuche einen minimalen C-terminalen Interaktionsbereich von nur 136 AS, der ausschließlich die FYRC-Region einschließt.

Wichtig ist es, an dieser Stelle zu erwähnen, dass auch Hsieh *et al.* eine entsprechend kleine C-terminale Domäne (nur FYRC-Region) in ihre Versuche integriert hatten, diese sich jedoch nicht als ausreichend für eine Interaktion erwies. Entsprechendes gilt in umgekehrtem Maße für den N-terminalen Interaktionsbereich. Yokoyama *et al.* konnten mit kleineren Fragmenten als den von ihnen postulierten minimalen 1000 AS keine Interaktion mehr nachweisen.

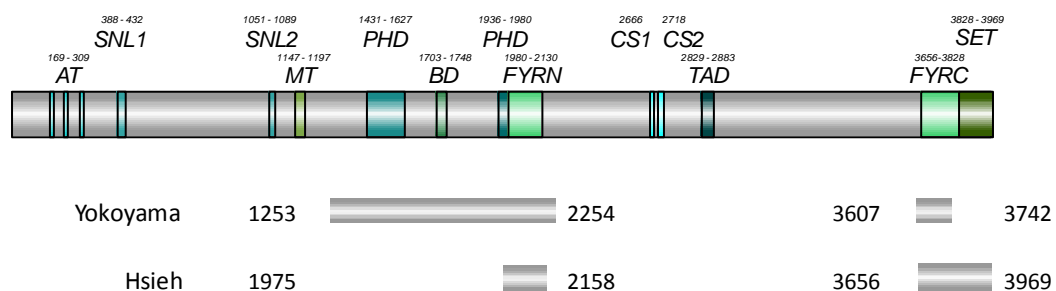


Abbildung 2-8: Darstellung der publizierten Interaktionsdomänen des MLL Proteins (Yokoyama *et al.* 2002, Hsieh *et al.* 2003b). Die Unterschiede in der Größe des jeweiligen Fragments sind deutlich zu erkennen.

Um eine Erklärung für die post-prozessive Assemblierung der beiden Fragmente zu erhalten, wurden unter anderem verschiedene MLL Konstrukte erzeugt, die an ihrem N- bzw. C-Terminus mit verschiedenen Farbmarkierungen versehen wurden (Hsieh *et al.*,

2003b). Mithilfe dieser Konstrukte wurden einige interessante Beobachtungen gemacht. Neben dem zusätzlichen Nachweis der stabilisierenden Wirkung des MLL_C auf das MLL_N Fragment konnte gezeigt werden, dass die typische subnukleäre Lokalisation des gesamten MLL Proteins ausschließlich durch das MLL_N Fragment vermittelt wird. Somit reguliert die Prozessierung des MLL Proteins sowohl die Menge als auch die Lokalisation der resultierenden Protein Fragmente.

2.6 Zielsetzung der Arbeit

Die onkogenen Eigenschaften des AF4/MLL Fusionsproteins kommen in Folge der Prozessierung und anschließender Komplexbildung der entstandenen Protein-Fragmente der4_N und MLL_C (= der4_C) zum Tragen. Nachdem sich der Komplex ausgebildet hat, akkumuliert dieser in der Zelle und bewirkt eine maligne Transformation. Aufgrund dieser Vorkenntnisse stellt das intramolekulare Interaktionsinterface ein potentiell therapeutisches Target dar. Sollte es gelingen, die Interaktion der beiden Fragmente zu inhibieren, könnten möglicherweise die onkogenen Effekte des AF4/MLL Fusionsprotein aufgehoben oder zumindest vermindert werden.

Um die Möglichkeit der Intervention der Interaktion als therapeutisches Mittel austesten zu können, sollten im ersten Schritt dieser Arbeit minimierte N- und C-terminale MLL Fragmente identifiziert werden, welche in der Lage sind, eine Interaktion zu vermitteln und daher als kompetitive Inhibitoren der intramolekularen Proteininteraktion eingesetzt werden können. Um sich der Problematik anzunähern, bestand die erste Aufgabe darin, die bis *dato* publizierten Interaktionsdomänen miteinander in Einklang zu bringen (vgl. Abschnitt 2.5.6. Intramolekulare Proteininteraktion des MLL Proteins). Aufgrund der offensichtlichen Unterschiede der beiden vorliegenden Publikationen bezüglich der präzisen Definition der MLL Interaktionsdomänen, musste zuerst geklärt werden, ob eine Verkleinerung der Proteinabschnitte überhaupt möglich ist. Mit dem Ziel, kleine MLL Fragmente möglicherweise als kompetitive Inhibitoren der Proteininteraktion des MLL Proteins sowie des AF4/MLL Fusionsproteins einsetzen zu können, sollten im Folgenden die Interaktionsbereiche weiter verkleinert werden. Die entsprechenden Versuche sollten unter Anwendung eines zellbasierten Protein-Translokator Systems durchgeführt werden.

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse und Beobachtungen während der Interaktionsanalyse sollte im Anschluss an die erfolgreiche Verkleinerung der Interaktionsdomänen ein ausgewähltes MLL Fragment exemplarisch auf sein Potential hin untersucht werden, mit den Gesamtproteinen MLL und AF4/MLL zu interagieren. Für den Interaktionsnachweis wurde die Anwendung zweier verschiedener Systeme geplant. Zum einen

sollte eine Co-Präzipitation der Gesamtproteine mit dem zu testenden Fragment als Interaktionsnachweis durchgeführt werden. Die Verwendung doppelt-farbmarkierter *full length* Proteine sollte zum anderen durch Co-Expression mit dem ausgewählten Fragment Aufschluss über eine mögliche Interaktion in lebenden Zellen geben.

Eine weitere experimentelle Beobachtung während der Interaktionsanalysen veranlasste die Bestimmung der Anzahl sterbender bzw. abgestorbener Zellen in Folge der Expression verschiedener ausgewählter MLL Fragmente. Zu Beginn sollte die Anzahl sterbender bzw. toter HeLa Zellen anhand optischer Bewertung morphologischer Veränderungen bestimmt werden. Im Anschluss sollten die toten Zellen der transfizierten Zellpopulationen von HeLa Zellen sowie t(4;11)-positiven SEM Zellen mittels Durchfluss-cytometrie ausgezählt werden.

3 ERGEBNISSE

3.1 Vereinigung der publizierten Interaktionsdomänen

Zu Beginn der Arbeit bestand die grundlegende Aufgabe darin, die vorhandenen Publikationen bezüglich der intramolekularen Proteininteraktion miteinander in Einklang zu bringen. Es bestand eine deutliche Divergenz hinsichtlich der beschriebenen minimalen Interaktionsdomänen. Das Ziel der anfänglichen Versuche war es, einen ersten Nachweis zu liefern, dass eine Verkleinerung der Interaktionsdomänen generell möglich ist.

3.1.1 Bakteriell-System

Um diese ersten Interaktionsversuche durchzuführen, wurde aufgrund der einfachen Handhabung und der schnellen Auswertungsmöglichkeit das bakterielle Zwei-Hybrid-System (*BacterioMatch® II Two-Hybrid System Vector Kit*, B2H-System) der Firma Stratagene verwendet (Dove *et al.*, 1997; Joung *et al.*, 2000). Der Nachweis der Protein-Proteininteraktionen beruht beim B2H-System auf der transkriptionellen Aktivierung des *HIS3* Reportergens im Reporterstamm, womit ein Wachstum der Bakterien auf speziellen Selektionsplatten möglich ist. Der Reporterstamm weist eine *hisB* Mutation auf, welche durch Aktivierung des *HIS3* Gens komplementiert werden kann. Ohne eine spezifische Aktivierung besteht eine kontinuierliche, aber sehr geringe Expression des *HIS3* Gens, welche ausreicht, ein Wachstum auf Histidin-Mangelmedium zu gewährleisten. In Anwesenheit von 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT), einem kompetitiven Inhibitor des His3 Enzyms, kann ein Wachstum der Bakterien nur beobachtet werden, wenn es zu einer starken transkriptionellen Aktivierung des *HIS3* Gens kommt. Auf diese Weise steigt die Menge des His3 Genprodukts so weit an, dass die kompetitive Hemmung überwunden werden kann. Überdies bietet das System eine Möglichkeit zur Verifizierung der erhaltenen Ergebnisse. Durch Aktivierung des *aadA* Gens, welches als zusätzliches Reportergen in den Bakterien vorhanden ist, wird eine zusätzliche Streptomycin-Resistenz verliehen.

Für die Untersuchung zweier potentiell interagierender Proteine stehen zwei Plasmide, pBT (*bait* = Köder Vektor) und pTRG (*target* = Beute Vektor) zu Verfügung (siehe Abbildung 3-1). Zum Nachweis einer potentiellen Interaktion müssen die cDNA-Sequenzen der Proteine (*bait* und *target*) in die zwei bereitgestellten Plasmide kloniert werden. Durch Klonierung des *bait*s in das pBT Plasmid kommt es zur Fusion mit dem

Repressorprotein des Bakteriophagen λ , λ cl, welches über seine DNA-Bindedomäne eine Bindung an die λ Operator-Sequenz bewirkt. Zusätzlich beinhaltet dieses Protein eine Dimerisierungsdomäne. Die *target* Protein cDNA Sequenz hingegen wird in den pTRG Vektor eingebracht, welcher seinerseits über die α -Untereinheit der RNA-Polymerase verfügt. Kommt es zwischen *bait* und *target* nach der Expression zu einer Interaktion, kann die RNA-Polymerase zum Promoter rekrutiert werden und dort die Transkription des *HIS3* Reportergens aktivieren. Als Positivkontrolle werden von Stratagene zwei Vektoren zur Verfügung gestellt, pBT-LGF2 und pTRG-Gal11p, die zwei miteinander interagierende Proteine exprimieren.

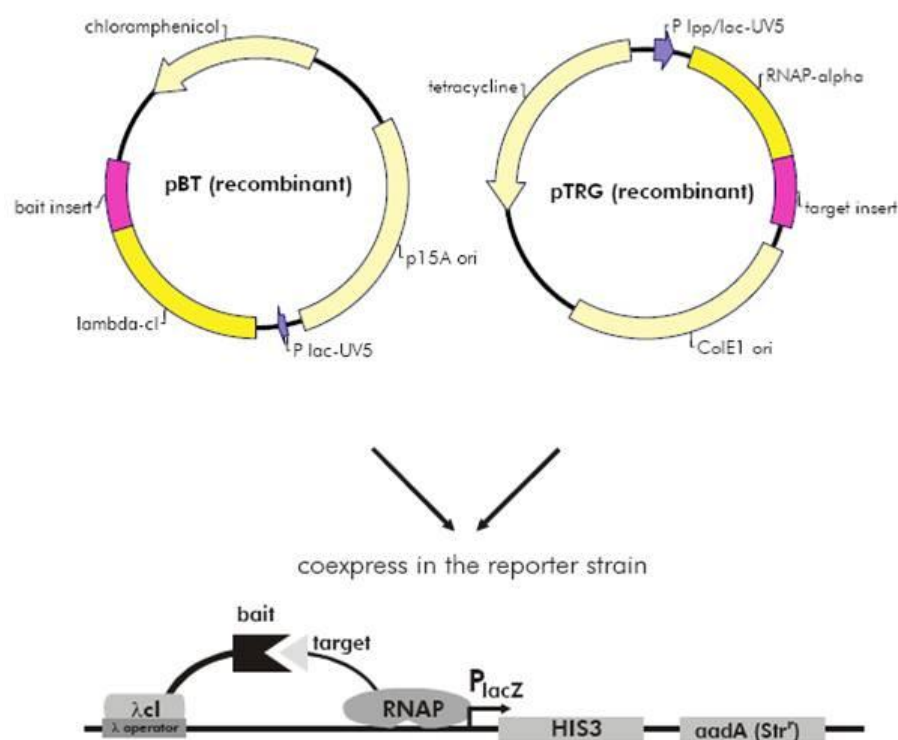


Abbildung 3-1: Schematische Darstellung des bakteriellen Zweihybrid-System. *bait* und *target* Vektor werden in den Reporterstamm co-transformiert. Interagieren die gebildeten Proteine miteinander, kommt es zur Aktivierung der Reportergenassette und zur Expression der Gene *HIS3* und *aada*. Auf diese Weise wird das Wachstum auf entsprechendem Selektionsmedium ermöglicht.

Auswahl der ersten Fragmente für den Interaktionstest

Bei Vergleich der beiden Publikationen, welche sich mit den Interaktionsdomänen des MLL Proteins beschäftigen, treten deutliche Unstimmigkeiten auf. Von den Autoren konnte je eine der beiden Interaktionsdomänen relativ eng eingegrenzt werden, während

der zugehörige Gegenpart in seiner Größe deutlich überwog. Die publizierten Angaben sind jedoch genau gegenläufig (vgl. Abschnitt 2.5.6 Intramolekulare Interaktion des MLL Proteins). Aus diesem Widerspruch resultierte die Hypothese, dass es sich bei den veröffentlichten Bereichen nicht um die minimalen Interaktionsdomänen des MLL Proteins handeln konnte. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden anhand beider Ergebnisse die ersten Fragmente für unsere eigenen Untersuchungen ausgewählt. Es wurde bestimmt, den initialen Test mit einem N-terminalen MLL Fragment sowie zwei C-terminalen MLL Fragmenten durchzuführen, um die Möglichkeit einer generellen Verkleinerung zu bestätigen. Die ausgewählten Bereiche sind in Abbildung 3-2 dargestellt.

a

Publizierte Interaktionsdomänen



b

Ausgewählte Testbereiche

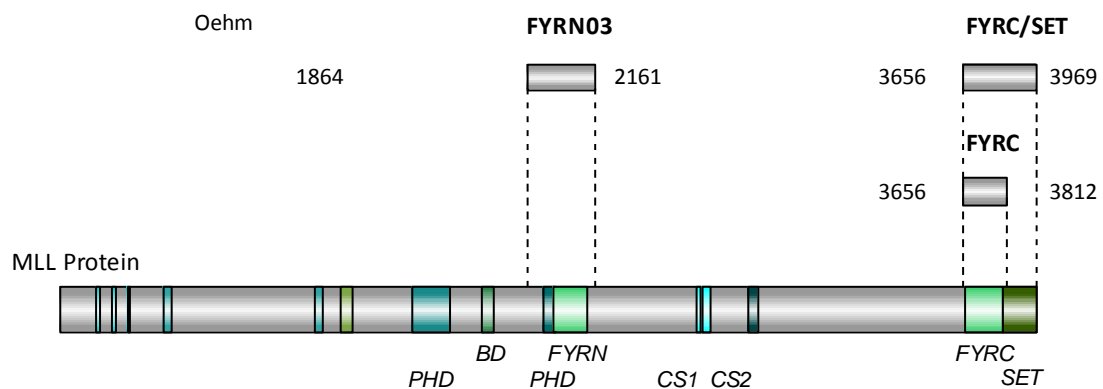


Abbildung 3-2: Darstellung der zu testenden Proteinfragmente im B2H-System. a) publizierte Interaktionsdomänen von Yokoyama *et al.*, 2002 und Hsieh *et al.*, 2003a, welche als Grundlage für die ersten Fragmente dienten; b) ausgewählte Fragmente für die primäre Interaktionsanalyse. Zur Darstellung der enthaltenen MLL Domänen ist das MLL Protein gezeigt. FYRN03: N-terminales MLL Fragment AS 1864 – 2161; FYRC/SET und FYRC: C-terminale MLL Fragmente AS 3656 – 3969 bzw. 3656 – 3812.

Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, wurde das N-terminale Fragment FYRN03 (AS 1864 – 2161) in der Art ausgewählt, dass sowohl die FYRN-Domäne als auch der PHD-Finger 4 im resultierenden Protein enthalten sind. Die zwei C-terminalen Fragmente, FYRC/SET (AS 3656 – 3969) und FYRC (AS 3656 – 3812), decken sich in etwa mit den verwendeten Fragmenten von Hsieh *et al.*, 2003b bzw. Yokoyama *et al.*, 2002. Auf diese Weise konnte die Unterschreitung einer möglichen Mindestgröße ausgeschlossen werden. Dies war ein wichtiges Kriterium für die Auswahl der Fragmente, da das vorrangige Ziel dieses Versuches ausschließlich eine erste Angleichung der beiden Publikationen darstellte.

Generierung der bakteriellen Plasmide

Die Auswahl einer geeigneten Kombination von cDNA und Plasmid wurde anhand der multiplen Klonierungsstellen (***Multiple Cloning Site MCS***) der beiden Plasmide pBT und pTRG sowie der cDNA-Sequenz aller ausgewählten Proteinfragmente getätigt. Es wurde entschieden, die C-terminalen Fragmente FYRC/SET und FYRC in den pTRG Vektor, und das N-terminale Fragment FYRN03 in das Plasmid pBT einzubringen. Da bereits ein Plasmid mit der cDNA Sequenz des FYRN03 Fragments existierte, sollte dieses durch eine Umklonierung mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *SfiI* in den pBT Vektor inseriert werden. Um passende Restriktionsschnittstellen im pBT Vektor zu erhalten, musste dessen MCS zu Beginn modifiziert werden (siehe Abbildung 3-3). Es wurden zwei Oligonukleotide generiert, welche nach Doppelstrang-Bildung als *NdeI-SfiI* Linker in den pBT Vektor eingebracht wurden. Dieser wurde hierfür unter Verwendung der Restriktionsenzyme *NotI* und *XhoI* geöffnet. Analog hierzu erfolgte die Synthese der Oligonukleotide in der Art, dass der gebildete Doppelstrang nach der „annealing“-Reaktion am 5'Ende einen *NotI*-Überhang bzw. am 3'Ende *XhoI*-Überhang aufwies. Die Ligation lieferte das modifizierte Plasmid pBT-MCS, welches nun die Restriktionsschnittstellen *NdeI*, *EcoRV* sowie *SfiI* bereit stellte und eine Klonierung des FYRN03 Fragments ermöglichte.

Zur Klonierung der cDNA Sequenzen der C-terminalen MLL Fragmente wurden diese mittels PCR an geeigneten Plasmiden amplifiziert. Entsprechend der MCS des Zielvektors wurden Oligonukleotide mit den Schnittstellen *BamHI* und *EcoRI* verwendet. Die Oligonukleotide enthielten passend zur MCS des pTRG Vektors die Schnittstellen *BamHI* und *EcoRI*, so dass eine gerichtete Klonierung möglich war.

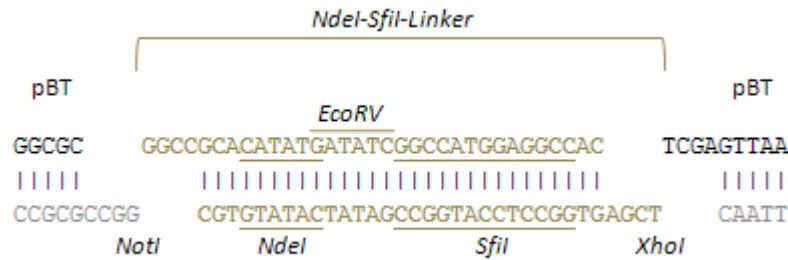


Abbildung 3-3: Schematische Darstellung des *NdeI-SfiI*-Linkers. Zur Erzeugung einer neuen *MCS* wurde der Linker über die Restriktionsschnittstellen *NotI* und *XhoI* in den pBT Vektor eingefügt.

Die korrekte Integration der Amplifikate wurde durch geeignete Restriktionsverdau kontrolliert (siehe Abbildung 3-4 a), die Sequenzen der PCR-Amplifikate wurden zusätzlich durch eine Sequenzierungsreaktion bestätigt. Die Klonierung der neuen *MCS* sowie des Fragments FYRN03 in das Plasmid pBT konnte ebenfalls mittels Restriktionsverdau kontrolliert werden (siehe Abbildung 3-4 b).

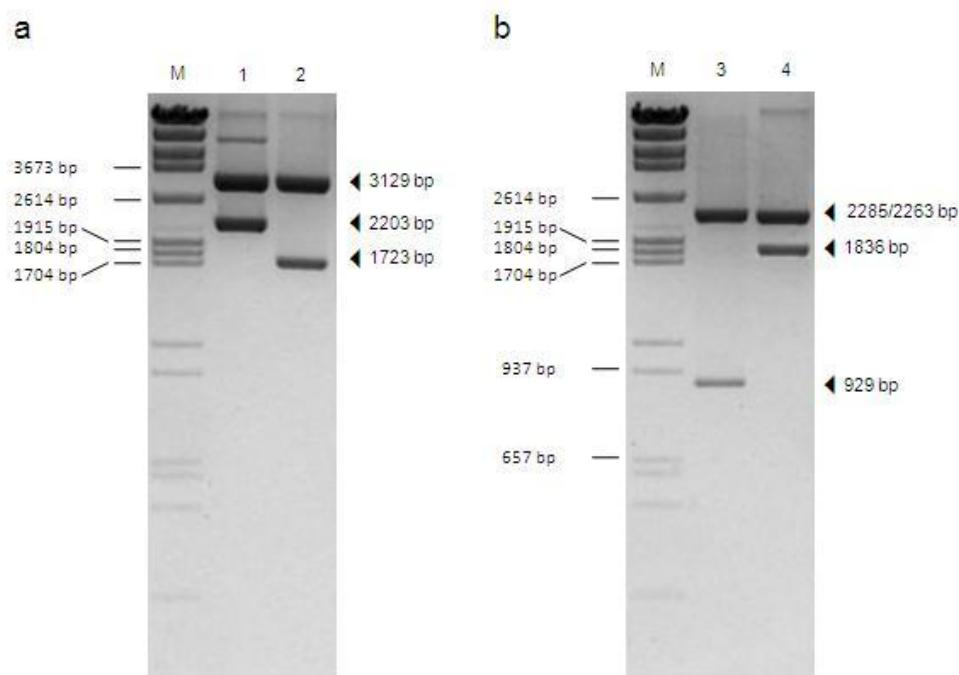


Abbildung 3-4: Restriktionsverdau der klonierten Plasmide für das B2H-System. a) pTRG-FYRC/SET (Spur 1) und pTRG-FYRC/SET Δ 150 (Spur 2) mit den Enzymen *NheI* und *XhoI*. b) pBT-MCS (Spur 3) und pBT-FYRN03 (Spur 4) mit den Enzymen *XbaI* und *EcoRV* bzw. *XbaI* und *XhoI*. Größen der Markerbanden (M) sowie die Größen der durch Restriktionsverdau erhaltenen Fragmente (◀) sind angegeben.

Interaktionstest im B2H-System

Nach der Verifizierung aller Konstrukte wurden sie zur Interaktionsanalyse der Fragmente in das B2H-System eingesetzt. Mittels Co-Transformation wurden die zu untersuchenden Fragmente in entsprechenden Kombinationen (entweder miteinander oder mit den entsprechenden Kontrollplasmiden) in den Reporterstamm eingebracht. Das Wachstum der transformierten Bakterien auf Selektionsplatten gab Aufschluss über die Interaktion der jeweiligen Proteine. Die Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Versuchen bestätigt und sind in Abbildung 3-5 dargestellt.

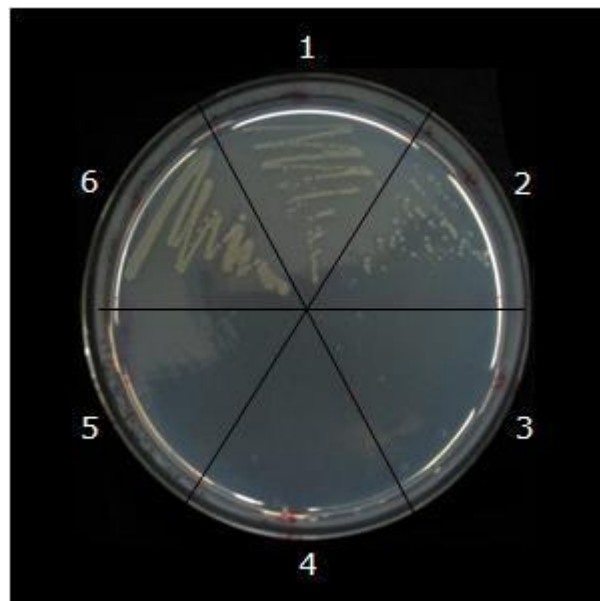


Abbildung 3-5: Untersuchung des bakteriellen Wachstums auf Selektionsplatten des B2H-Systems (6,5µg/ml Tetracyclin, 34µg/ml Chloramphenicol, 5mM 3-AT). Verwendete Plasmide für die Co-Transformation: 1: pBT-MCS-FYRN03 und pTRG-FYRC; 2: pBT-MCS-FYRN03 und pTRG-FYRC/SET; 3: pBT-MCS und pTRG-FYRC; 4: pBT-MCS und pTRG-FYRC/SET; 5: pBT-MCS-FYRN03 und pTRG; 6: pBT-LGF2 und pTRG-Gal11p.

Es konnte eine Interaktion des N-terminalen MLL Fragments FYRN03 sowohl mit dem FYRC/SET als auch mit dem FYRC Fragment des MLL C-Terminus nachgewiesen werden (Bereich 1 bzw. 2). Beide Proteinkombinationen ermöglichten durch die Aktivierung der Reportergene das bakterielle Wachstum auf Selektionsplatten. Die Spezifität der Interaktion wurde durch Kontroll-Co-Transformationen mit den entsprechenden Leerplasmiden bestätigt, welche kein Wachstum der Bakterien erlaubten (Bereiche 3 bis 5). Die Positivkontrolle mit den Vektoren pBT-LGF2 und pTRG-Gal11p zeigt die prinzipielle Gültigkeit des jeweiligen Versuchs. Bei den verschiedenen

Co-Transformationen ist ein deutlicher Unterschied bezüglich der Ausprägung des bakteriellen Wachstums zu sehen, welcher auf eine unterschiedlich starke Interaktion der gebildeten Proteine hindeutet. Zur Verifizierung der positiven Interaktion wurden die Klone der Bereiche 1 und 2 zusätzlich auf Streptomycin Platten ausgestrichen; auch hier konnte ein Wachstum beobachtet werden.

Folgende Tabelle fasst die Ergebnisse dieser Versuche zusammen:

Tabelle 3-1: Ergebnisse der Interaktionsanalyse im B2H-System

Bereich	Plasmide für Co-Transformation	Ergebnis
1	pBT-MCS-FYRN03 + pTRG-FYRC	Interaktion
2	pBT-MCS-FYRN03 + pTRG-FYRC/SET	Interaktion
3	pBT-MCS + pTRG-FYRC	keine Interaktion
4	pBT-MCS + pTRG-FYRC/SET	keine Interaktion
5	pBT-MCS-FYRN03 + pTRG	keine Interaktion
6	pBT-LGF2 + pTRG-Gal11p	Interaktion

Die erhaltenen Ergebnisse belegen eindeutig, dass es durchaus möglich ist, die Interaktionsdomänen weiter einzugrenzen. Um jedoch die natürliche Situation der Proteine besser nachzuempfinden, wurden alle weiteren Interaktionsstudien in einem humanen Zellsystem durchgeführt (siehe Abschnitt 3.2. – Zellbasiertes Zweihybrid Protein-Translokation-Biosensor-System).

3.2 Minimierung der Interaktionsdomänen

Nachdem im ersten Schritt der generelle Nachweis erbracht wurde, dass die Interaktionsdomänen potentiell verkleinert werden können, mussten im Folgenden weitere Fragmente für die Interaktionsanalyse ausgewählt werden. Ebenso sollte ein humanes Zellsystem für den Interaktionsnachweis verwendet werden. Um die Anwendbarkeit dieses Systems zu demonstrieren, wurden die bereits im B2H-System bestimmten Interaktionsdomänen erneut getestet.

3.2.1 Zellbasiertes Zweihybrid Protein-Translokation-Biosensor (PTB)-System

In diesem *in vivo* System wird der Vorteil fluoreszierender Proteine mit der Möglichkeit des regulierten nucleo-cytoplasmatischen Transports in der Art kombiniert, dass eine

Proteininteraktion auf sehr einfache Weise sichtbar gemacht werden kann (Knauer and Stauber, 2005). Wie für alle Zweihybrid-Systeme üblich, existieren auch hier zwei verschiedene Vektoren, in diesem Fall als *prey* und *bait* Vektoren bezeichnet (siehe Abbildung 3-6 a). Das *prey* Plasmid, p3-NLS-GFP/GST-NES, setzt sich aus der kodierenden Sequenz des *green fluorescent protein* GFP, einem GST-tag, einer nukleären Lokalisationssequenz (SV40 NLS) sowie einer nukleären Exportsequenz (HIV-1 RevNES) zusammen. Dies verleiht dem fusionierten Protein die Eigenschaft zwischen Nukleus und Cytoplasma zu translozieren. Die Fusion mit GFP ermöglicht eine Lokalisationsbestimmung des Proteins unter dem Fluoreszenz-Mikroskop. Wird der *prey* Vektor allein in eine Zelle eingebracht, kann man das GFP vorwiegend im Cytoplasma detektieren. Der Vektor kodiert zwar, wie beschrieben, gleichzeitig für eine nukleäre Lokalisations- als auch eine nukleäre Exportsequenz, letztere wirkt sich jedoch stärker aus. Der *bait* Vektor hingegen, pc3-RevM10BL-BFP, weist zur Detektion innerhalb der Zelle die cDNA Sequenz einer BFP (*blue fluorescent protein*) Variante auf. Zusätzlich verfügt er über eine Export-defiziente Mutante des HIV-1 Rev Proteins (RevM10BL), welches eine starke nukleoläre Lokalisationssequenz repräsentiert und eine nukleoläre Verankerung des fusionierten Proteins bewirkt. Dementsprechend wird das vom *bait* Vektor gebildete BFP immer am Nukleolus zu finden sein. Um eine Interaktionsanalyse zweier Proteine durchzuführen, werden die zwei Plasmide mit den entsprechenden kodierenden Sequenzen mittels Co-Transfektion in Zellen eingeschleust. Die Lokalisation der Proteine wird unter dem Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet. Die zwei möglichen Konstellationen, Interaktion bzw. keine Interaktion, sind in Abbildung 3-6 b schematisch wiedergegeben. Treten zwei Proteine miteinander in Wechselwirkung, kommt es zu einer Co-Lokalisation der beiden Fluoreszenzmarker GFP und BFP an den Nukleoli. Sind die Proteine nicht in der Lage miteinander zu interagieren, so finden sich die beiden Fluoreszenzproteine getrennt voneinander im Cytoplasma (GFP) bzw. an den Nukleoli (BFP). Als Kontrolle dienen Co-Transfektionen der zu untersuchenden Plasmide zusammen mit den „leeren“ Ausgangsvektoren. Kommt es bei diesen Kontrollen zu einer Co-Lokalisation der Markerproteine, spricht man von einer Blind-Interaktion. Das System ist für Interaktionsstudien mit dem betreffenden Protein ungeeignet.

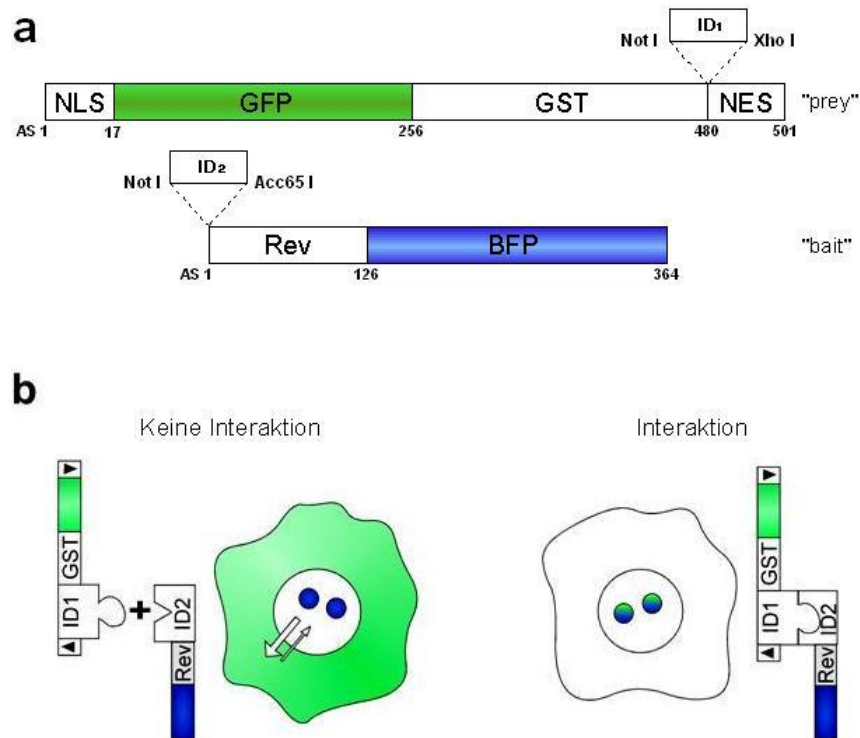


Abbildung 3-6: Zellbasiertes Zweihybrid Protein-Translokation-Biosensor-System. a) Schematische Darstellung des Aufbaus von *prey* und *bait* Protein. Die Restriktionsschnittstellen für die Klonierung der cDNA sind angegeben. b) Funktionsprinzip des Interaktionssystems. Das GFP-*prey* Fusionsprotein pendelt bei fehlender Interaktion zwischen Cytoplasma und Zellkern hin und her, das *bait*-BFP Fusionsprotein wird an den Nukleoli zurück gehalten. Bei bestehender Interaktion sind beide Proteine gemeinsam an den Nukleoli lokalisiert. ID: Interaktionsdomäne; ◀ : NES; ▶ : NLS. (aus Knauer and Stauber, 2005)

Anwendbarkeitstest des Zweihybrid PTB-Systems

Die beiden Plasmide dieses zellbasierten Systems, pc3-RevM10BL-BFP und p3-NLS-GFP/GST-RevNES, stellen für die Klonierung der cDNAs je zwei Restriktionsschnittstellen zur Verfügung. Aufgrund der DNA Sequenzen der verschiedenen Fragmente erfolgte die Klonierung aller C-terminalen MLL Domänen, zu Beginn FYRC/SET sowie FYRC, in den Vektor p3-NLS-GFP/GST-RevNES. Die N-terminalen Fragmente, im ersten Schritt FYRN03, wurden in das Plasmid pc3-RevM10BL-BFP eingebracht. Die entsprechenden cDNA Bereiche wurden mittels PCR unter Verwendung geeigneter Oligonukleotide amplifiziert, so dass im Folgenden eine gerichtete Klonierung möglich war. Es sei darauf hingewiesen, dass zu Beginn der Arbeit ein *bait* Vektor verwendet wurde, der zur Insertion verschiedener cDNAs lediglich über eine *Acc65I* Schnittstelle verfügte. Im späteren Verlauf konnte ein modifizierter Vektor verwendet werden, der sich ausschließlich durch das Vorhandensein einer zusätzlichen

NotI Schnittstelle unterscheidet. Als Template konnten die bereits klonierten bakteriellen Vektoren des B2H-Systems verwendet werden. Die korrekte Integration der Fragmente wurde durch Restriktionsverdau kontrolliert (siehe Abbildung 3-7), die Sequenz der Amplifikate wurde mittels Sequenzierung überprüft.

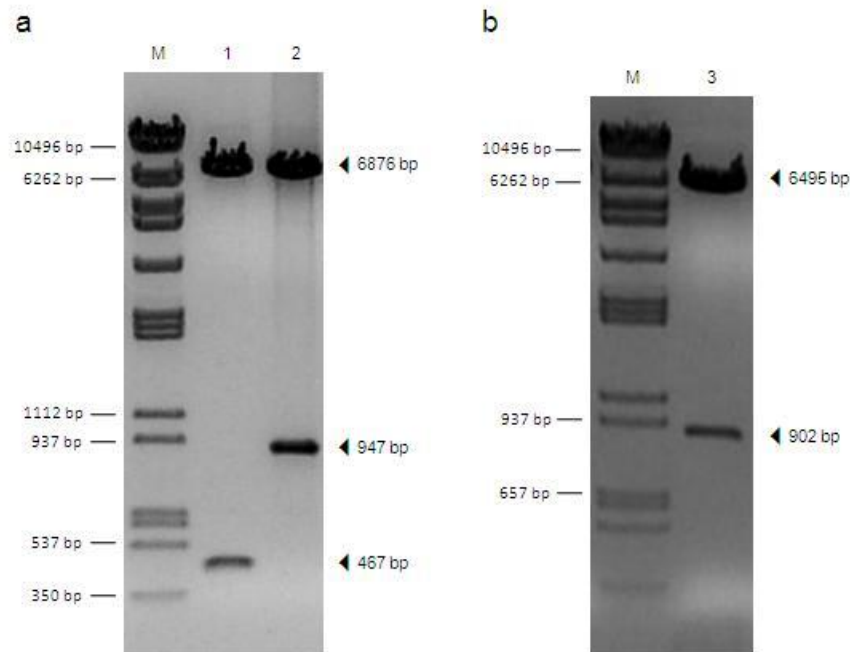


Abbildung 3-7: Restriktionsverdau der klonierten Plasmide für das PTB-System (I). a) p3-GFP-FYRC/SET (Spur 1) und p3-GFP-FYRC (Spur 2) mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *XhoI*. b) pc3-FYRN03-BFP (Spur 3) mit dem Restriktionsenzym *Acc65I*. Größen der Markerbanden (M) sowie die Größen der durch Restriktionsverdau erhaltenen Fragmente (◄) sind angegeben.

Im Anschluss an die erfolgreiche Klonierung der Plasmide erfolgte die Interaktionsanalyse in HeLa Zellen. Zu Beginn der Arbeit wurden alle Co-Transfektionen unter Verwendung von Lipofectamin (Invitrogen, USA) durchgeführt. Aufgrund verschiedener Faktoren wurde später auf die Transfektion mit dem kationischen Polymer Polyethylenimin (PEI) umgestellt (weniger Zeitaufwand, weniger Kosten, ähnliche Transfektionsrate bei Co-Transfektionen). Die Auswertung der Interaktionsversuche erfolgte 24 Stunden nach Transfektion unter Verwendung des Fluoreszenz-Mikroskops mit entsprechenden Fluoreszenz-Filtern (Stauber *et al.*, 1998).

Abbildung 3-8 zeigt die Fluoreszenzbilder der Interaktionsanalyse der Fragmente FYRN03 und FYRC (obere Reihe) sowie die zugehörigen Kontrollen (mittlere und untere Reihe).

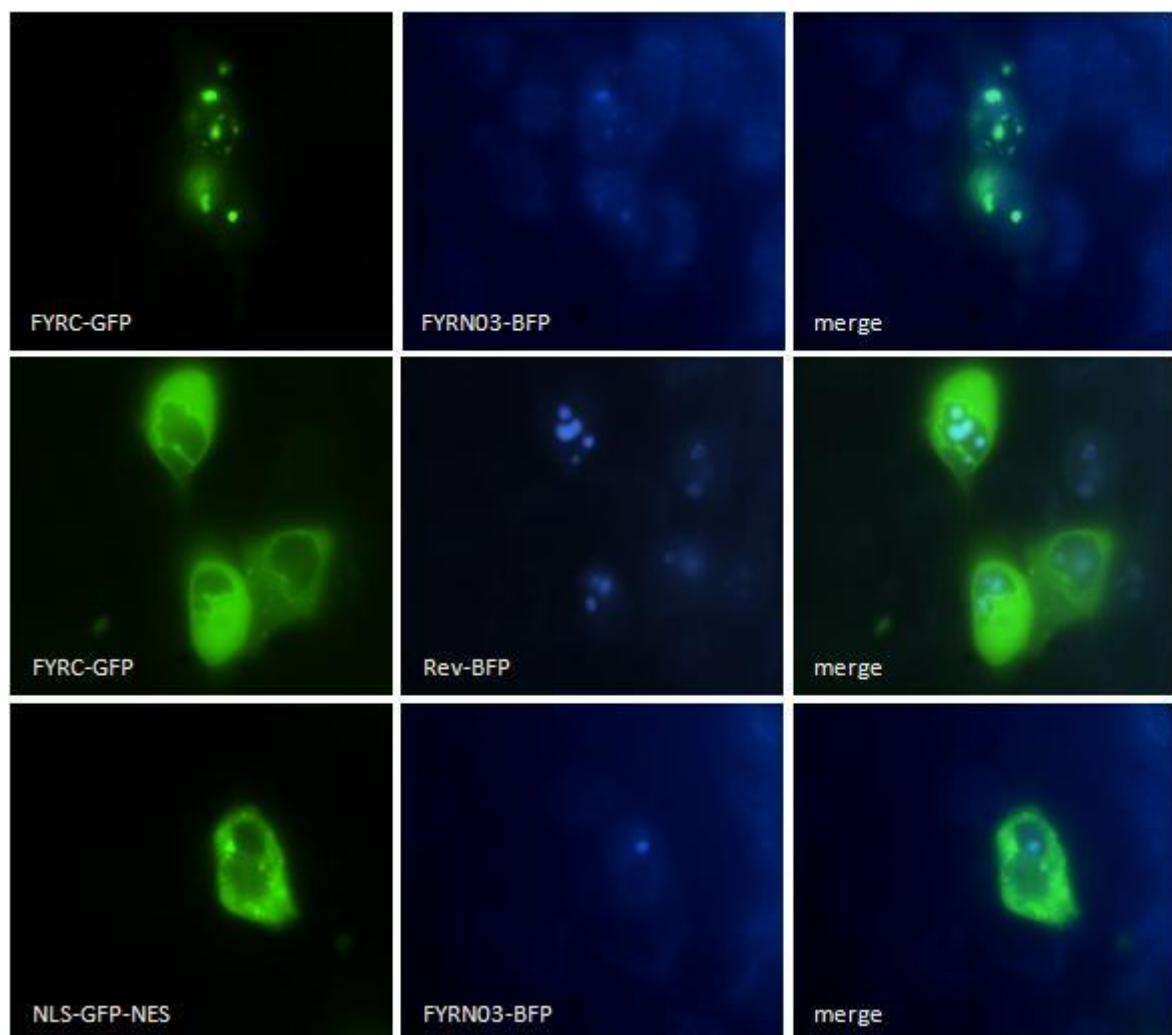


Abbildung 3-8: Mikroskopische Analyse des Interaktionstest der MLL Domänen FYRC und FYRN03 in HeLa Zellen. Obere Reihe: Die Co-Expression der beiden MLL Fragmente resultiert in der Co-Lokalisation der Markerproteine. Mittlere und untere Reihe: Kontroll-Co-Transfektionen; keine Co-Lokalisation der Markerproteine.

Ohne einen passenden Interaktionspartner befindet sich das C-terminale MLL Fragment verteilt im Cytoplasma (mittlere Reihe, Bild 1). Durch die Interaktion mit dem N-terminalen Gegenpart FYRN03 kommt es zur Verlagerung von FYRC aus dem Cytoplasma in den Zellkern an die Nukleoli (obere Reihe; Bild 1), so dass es im 2-Farben-Fluoreszenzbild zur einer Überlagerung der beiden Markerproteine BFP und GFP kommt (obere Reihe; Bild 3). Eine mögliche Verschiebung des GFP Signals durch eine unspezifische Interaktion mit FYRN03 kann durch das Ergebnis der entsprechenden Kontroll-Transfektion ausgeschlossen werden (untere Reihe). In diesem Fall ist deutlich eine getrennte Lokalisation von BFP und GFP zu erkennen. Die

Interaktion der Proteinfragmente FYRN03 und FYRC konnte demzufolge auch in diesem System zweifelsfrei nachgewiesen werden.

Bei Analyse der Co-Expression von FYRN03 mit dem größeren C-terminalen MLL Fragment FYRC/SET konnte wider Erwarten keine Interaktion gezeigt werden (siehe Abbildung 3-9). Während BFP stets an den Nukleoli detektiert wurde, befand sich das FYRC/SET-GFP Fusionsprotein sowohl bei der Kontrolle (untere Reihe, Bild 1) als auch bei Co-Expression mit FYRN03 (obere Reihe, Bild 1) ausschließlich im Cytoplasma. Die überlagerten Bilder (obere und untere Reihe, Bild 3) bestätigten die getrennte Lokalisation der Markerproteine. Dieses Ergebnis spricht gegen eine Interaktion der beiden Fragmente.

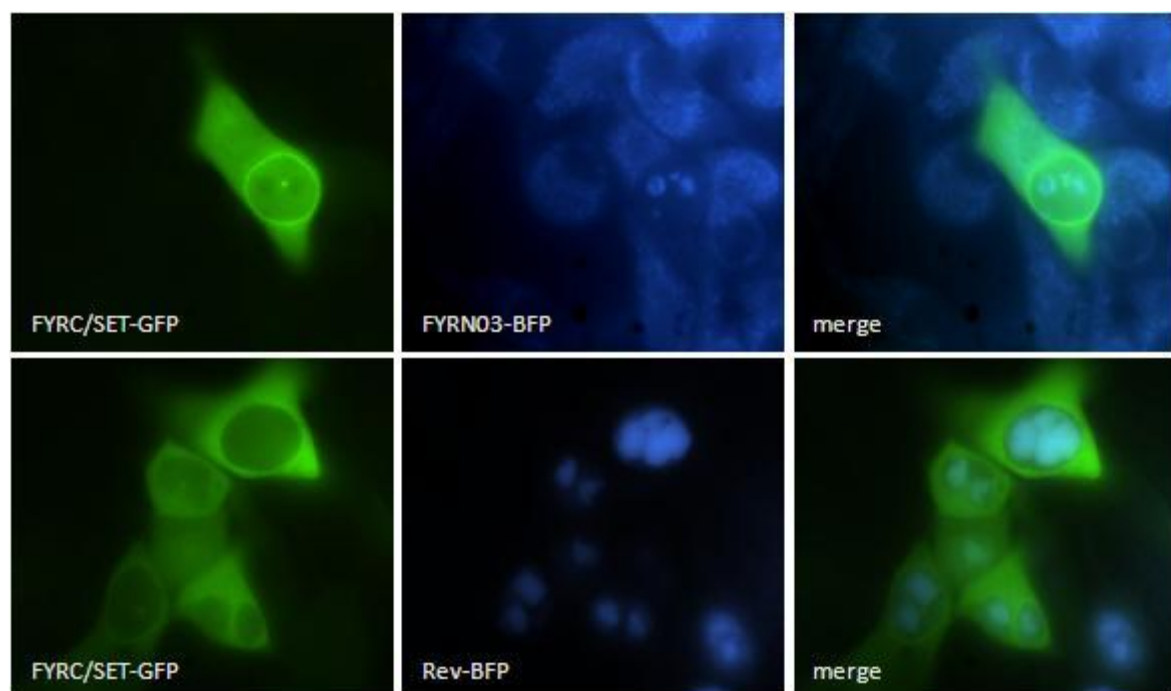


Abbildung 3-9: Mikroskopische Analyse des Interaktionstests der MLL Domänen FYRC/SET und FYRN03 in HeLa Zellen. Obere Reihe: Die Co-Expression der beiden MLL Fragmente führt nicht zur einer Co-Lokalisation der Markerproteine. Während das BFP an den Nukleoli lokalisiert ist befindet sich das GFP im Cytoplasma der Zellen. Dieses Bild entsteht durch eine fehlende Interaktion der Proteine. Untere Reihe: Kontroll-Co-Transfektion; keine Co-Lokalisation der Markerproteine.

Zusammengefasst lassen die Resultate dieser Interaktionsstudien verschiedene Schlussfolgerungen zu. Der positive Interaktionsnachweis von FYRN03 mit FYRC zeigt eine generelle Anwendbarkeit dieses Systems für weitere Interaktionsanalysen. Zudem konnten die Ergebnisse des B2H-Systems bezüglich dieser beiden Fragmente bestätigt

werden. Die fehlende Interaktion der Fragmente FYRN03 mit FYRC/SET hingegen widerspricht auf den ersten Blick den Resultaten des B2H-Systems. Allerdings wurde bereits bei diesen Versuchen eine schwächere Interaktion der größeren Fragmente vermutet (vgl. Abschnitt 3.1.1 Bakteriell-System – Interaktionstest im B2H-System). Da sich zusätzlich die Expression des FYRN03-BFP Fusionsproteins im zellulären System generell als sehr schwach erwies (vgl. Abbildung 3-9 obere Reihe, mittleres Bild = FYRN03-BFP Expression mit untere Reihe, mittleres Bild = Rev-BFP Expression), könnte dies zusammengenommen die fehlende Interaktion der Fragmente in dem zellulären *in vivo* System ansatzweise erklären.

3.2.2 Theoretisches Design verkürzter Fragmente für die Interaktionsanalyse

Um bei der weiteren Eingrenzung der Interaktionsdomänen sinnvoll vorzugehen, wurden die interagierenden Abschnitte FYRN03 (AS 1864 – 2161) und FYRC (AS 3656 – 3812) bezüglich ihres Aufbaus bzw. ihrer AS-Komposition genauer analysiert. In der Literatur sind die beiden Domänen FYRN_{Lit} und FYRC_{Lit}, welche in den bestätigten Interaktionsdomänen enthalten sind, als Phenylalanin (F) und Tyrosin (Y) reiche Regionen beschrieben. Diese aromatischen Aminosäuren sind in der Lage, durch Wechselwirkung mit positiv geladenen, kationischen Aminosäuren die Proteinfaltung zu beeinflussen und zu stabilisieren. Die genauere Betrachtung der Aminosäure-Zusammensetzung der beiden Bereiche zeigte eine Häufigkeit von ca. 7% für diese beiden Aminosäuren im Vergleich zu nur 3,9% im Gesamtprotein. Neben F und Y ist ebenfalls der Gehalt an positiv (Arginin = R und Lysin = K) als auch negativ (Aspartat = D und Glutamat = E) geladenen Aminosäuren im Vergleich zum Gesamtprotein leicht erhöht. Über die gegensätzlichen Ladungen wird potentiell die Ausbildung einer ionischen Proteininteraktion begünstigt.

Tabelle 3-2: Häufigkeit der Aminosäuren F, Y, D, E, R und K. Vergleich von Gesamtprotein zu den Bereichen FYRN_{Lit} und FYRC_{Lit}.

Aminosäuren	F + Y		D + E		R+ K	
	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
Gesamtprotein	101 + 53	3,9%	181 + 254	11%	229 + 304	13%
FYRN03	7 + 3	6,6%	10 + 14	16%	11 + 6	11%
FYRC	10 + 2	6,9%	8 + 18	15%	13 + 17	17%

Eine weitere Auffälligkeit, speziell im Bereich der FYRN_{Lit}-Domäne, stellt die Häufung und die Verteilung von Prolin-Resten dar. Aufgrund der besonderen Struktur des Prolins (Imino-Gruppe) wird durch das Vorhandensein in Polypeptiden die Ausbildung von α -Helices wie auch β -Faltblättern unterbrochen. Es verleiht dem Protein eine recht starre Konformation und ist vermehrt in Random-coils oder auch in β -Schleifen zu finden und wird auch als Strukturbrecher beschrieben. In unmittelbarer Nähe zu den Prolin-Resten finden sich in einigen Fällen Glycin-Reste, welchen ebenfalls eine Beteiligung an der Ausbildung von β -Schleifen zugesprochen wird. Die beschriebenen Besonderheiten der Aminosäure-Sequenz lassen eine Unterteilung des entsprechenden Bereiches innerhalb der FYRN_{Lit}-Domäne in potentielle strukturelle Einheiten zu und führen zu einer hypothetischen Protein-Struktur (siehe Abbildung 3-10). In Anlehnung an diese Struktur wurde ein passender Abschnitt im Bereich der FYRC_{Lit}-Domäne ausgewählt, der ähnliche Merkmale aufwies. Anhand dieses theoretischen Designs entstand folgende hypothetische Kontaktdomäne:

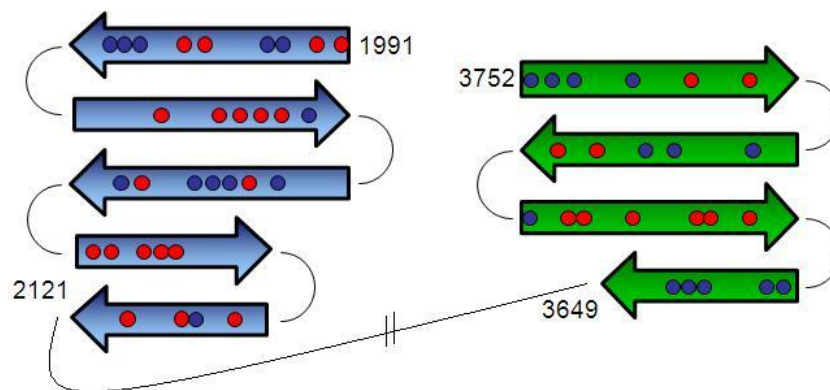


Abbildung 3-10: Hypothetische Interaktionsstruktur des MLL Proteins. Blaue Blockpfeile: potentielle N-terminale Interaktionsdomäne des MLL Proteins von AS 1191 – AS 2121; grüne Blockpfeile: potentielle C-terminale Interaktionsdomäne des MLL Proteins von AS 3649 – AS 3752. Die Blockpfeile repräsentieren potentielle strukturelle Elemente, welche durch Prolin-Reste und teilweise Glycin-Reste unterteilt werden. ●: saure Aminosäuren; ●: basische Aminosäuren. ||: CSI und CSII.

Interaktionsanalyse unter Berücksichtigung des theoretischen Designs – erster Verkleinerungsschritt

In Anlehnung an dieses hypothetische Design wurden zunächst zwei neue Fragmente zur Interaktionsanalyse erzeugt, FYRN (AS 1991 – 2121) sowie FYRCshort (AS 3649 –

3752). Bei positivem Interaktionsnachweis bietet die Unterteilung der Bereiche durch die Prolin-Reste einen guten Ansatz, kürzere Fragmente zu generieren und zu untersuchen. Die Amplifikation der zugehörigen cDNAs erfolgte an den zuvor generierten Plasmiden. Auch in diesem Fall wurden die erzeugten Plasmide mittels Kontrollverdau (Abbildung 3-11) und Sequenzierung überprüft und bestätigt.

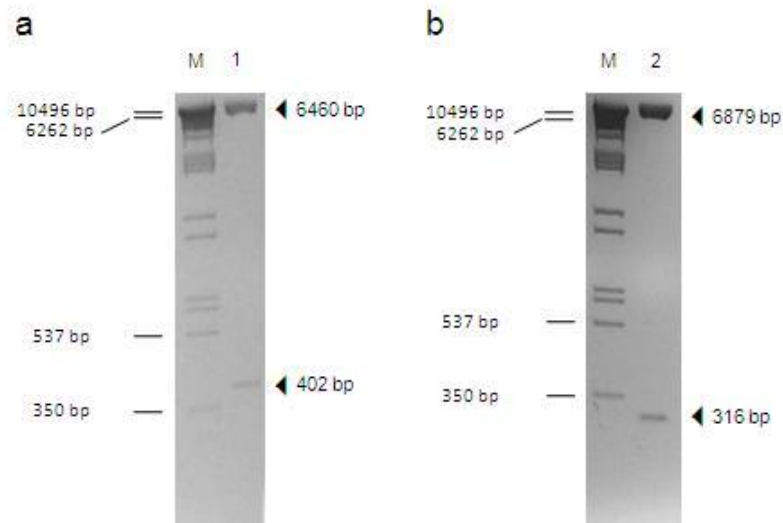


Abbildung 3-11: Restriktionsverdau der klonierten Plasmide für das PTB-System (II). a) pc3-FYRN-BFP (Spur 1) mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *Acc65I*. b) p3-GFP-FYRCshort (Spur 2) mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *XhoI*. Größen der Markerbanden (M) sowie die Größen der durch Restriktionsverdau erhaltenen Fragmente (◄) sind angegeben.

Im Anschluss erfolgte die Co-Transfektion der Plasmide in HeLa Zellen und die Auswertung mittels Fluoreszenz-Mikroskopie. Das Resultat ist in Abbildung 3-12 gezeigt, die zugehörigen Kontrollen sind nicht dargestellt, waren jedoch negativ.

Wie eindeutig zu erkennen ist, sind die verwendeten Fragmente weiterhin in der Lage miteinander zu interagieren. Es ist eindeutig eine Co-Lokalisation der Proteine BFP und GFP zu erkennen, obwohl auch im Cytoplasma der Zelle GFP detektiert werden kann. Dies ist möglicherweise auf ungleiche Mengen beider Markerproteine zurückzuführen. Die Bindungsstellen des FYRN-BFP Proteins für das C-terminale MLL Fragment sind vermutlich bereits gesättigt, so dass das übrige Protein nicht mehr im Zellkern zurückgehalten wird. Trotzdem galt die Interaktion der beiden Fragmente FYRN und FYRCshort damit als bestätigt.



Abbildung 3-12: Mikroskopische Analyse des Interaktionstest der MLL Domänen FYRCshort und FYRN in HeLa Zellen. Das FYRCshort-GFP Fusionsprotein kann sowohl im Cytoplasma als auch an den Nukleoli detektiert werden (linkes Bild). Die Retention an den Nukleoli beruht auf einer Interaktion mit dem FYRN Fragment.

Weitere Aufteilung der Interaktionsdomänen FYRN und FYRCshort

Im Folgenden erfolgte eine weitere Verkleinerung der Bereiche anhand der hypothetischen Interaktionsstruktur. Die beiden bestätigten Interaktionsdomänen FYRN und FYRCshort wurden in je 4 kleinere Abschnitte unterteilt. In Abbildung 3-13 ist die theoretische Interaktionsstruktur erneut dargestellt, die neuen Fragmente sind aufgezeigt.

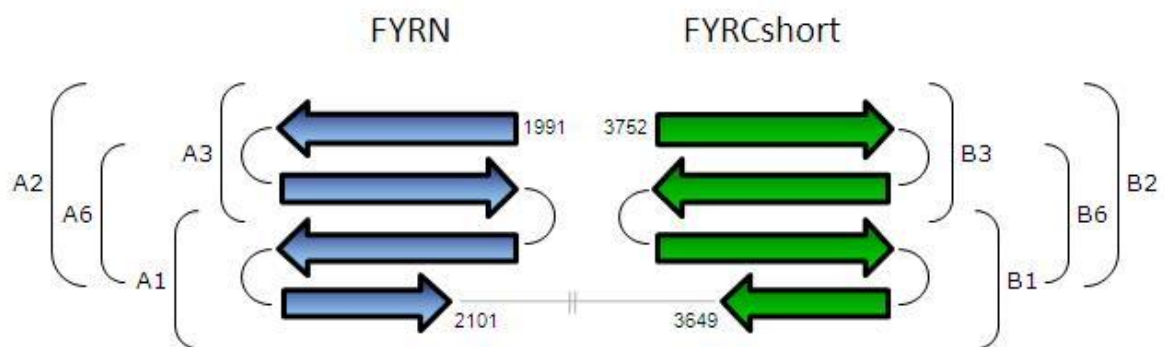


Abbildung 3-13: Darstellung der nachgewiesenen Interaktionsdomänen. Die neuen zu testenden Fragmente sind markiert. Die Blockpfeile repräsentieren potentielle strukturelle Elemente, welche durch Prolin-/Glycin-Reste unterteilt werden. Blaue Blockpfeile: N-terminaler Interaktionsbereich des MLL Proteins. Generierte N-terminale Fragmente: FYRN_A1 = AS - 2049 - 2101, FYRN_A2 = 1991 - 2078, FYRN_A3 = 1991 - 2048, FYRN_A6 = 2019 - 2078. Grüne Blockpfeile: C-terminaler Interaktionsbereich des MLL Proteins. Generierte C-terminale Fragmente: FYRC_B1 = 3649 - 3696, FYRC_B2 = 3668 - 3752, FYRC_B3 = 3697 - 3752, FYRC_B6 = 3668 - 3725. ¶: CSI und CSII.

Nach erfolgreicher Klonierung aller Vektoren, welche erneut mittels Kontrollverdau und Sequenzierung kontrolliert wurden (siehe Abbildung 3-14), erfolgten die Interaktionsanalysen in HeLa Zellen.

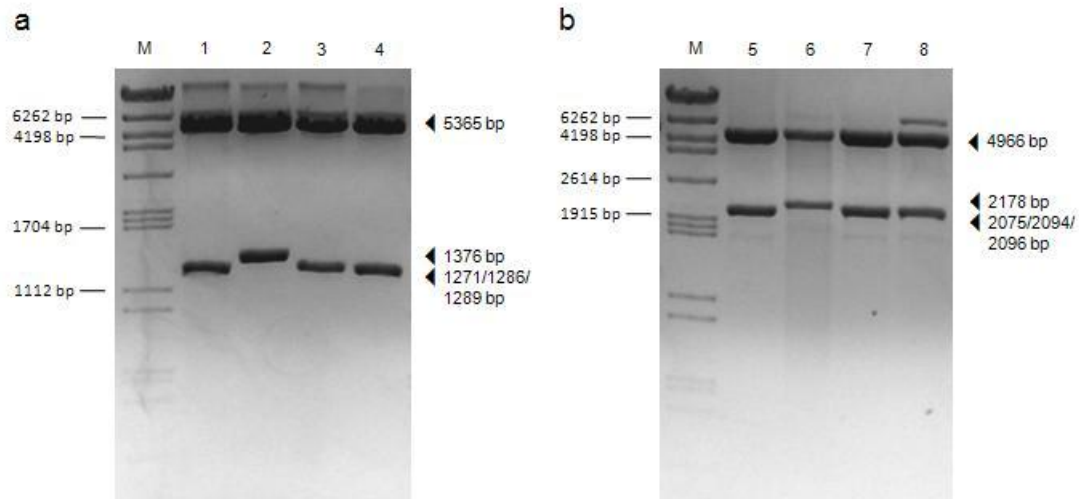


Abbildung 3-14: Restriktionsverdau der klonierten Plasmide für das PTB-System (III). a) pc3-FYRN_A1-BFP (Spur 1), pc3-FYRN_A2-BFP (Spur 2), pc3-FYRN_A3-BFP (Spur 3) und pc3-FYRN_A6-BFP (Spur 4) mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *XbaI*. b) p3-GFP-FYRC_B1 (Spur 5), p3-GFP-FYRC_B2 (Spur 6), p3-GFP-FYRC_B3 (Spur 7) und p3-GFP-FYRC_B6 (Spur 8) mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *EcoRV*. Größen der Markerbanden (M) sowie die Größen der durch Restriktionsverdau erhaltenen Fragmente (◄) sind angegeben.

Sollte die theoretisch generierte Interaktionsstruktur zutreffen, müsste jeweils eine Interaktion zwischen den Fragmenten FYRN_A1 und FYRC_B1, FYRN_A2 und FYRC_B2, FYRN_A3 und FYRC_B3 sowie FYRN_A6 und FYRC_B6 zu beobachten sein (vgl. Abbildung 3-13). Die ersten Co-Transfektionen mit den neuen Fragmenten wurden folglich mit den entsprechenden Kombinationen durchgeführt. Gleichzeitig wurden die zugehörigen Kontrollansätze mitgeführt. Die Ergebnisse der Interaktionstests sind in den Abbildungen 3-15 bis 3-17 auf den folgenden Seiten dargestellt.

Bei den Co-Transfektionen der N-terminalen MLL Fragmente FYRN_A1, - A2, - A3 sowie - A6 mit dem Leervektor p3-NLS-GFP/GST-NES (siehe Abbildung 3-15, Seite 56) zeigte sich in allen Fällen eine getrennte Lokalisation der beiden Markerproteine, so dass alle Fragmente in die Interaktionsanalysen eingesetzt werden konnten.

Die Auswertung der Kontroll-Transfektionen der C-terminalen Fragmente (Abbildung 3-16, Seite 57) FYRC_B1 und FYRC_B6 zeigt eine schwache Blind-Interaktion mit dem Markerprotein Rev-BFP. Das GFP Fusionsprotein zeigt eine deutliche, wenn auch unvollständige Translokation an die Nukleoli. Identifikationen potentieller Proteininteraktionen mit anderen Proteinen sind demzufolge nicht eindeutig möglich. Die Fragmente FYRC_B2 und FYRC_B3 hingegen sind deutlich im Cytoplasma lokalisiert, zeigten dementsprechend keine Blind-Interaktion mit dem Rev-BFP Markerprotein und konnten ohne Bedenken für die Interaktionsstudien genutzt werden.

Die Interaktionsanalyse (siehe Abbildung 3-17, Seite 58) zeigt für die Fragmente FYRC_B2 zusammen mit FYRN_A2 (Reihe 2) eine deutliche Co-Lokalisation und weist damit die Interaktion der beiden Fragmente nach. Die getrennte Lokalisation der Markerproteine bei den jeweiligen Kontroll-Transfektionen (vgl. Abb. 3-15 und 3-16 jeweils Reihe 2) belegt die Spezifität der hier gezeigten Interaktion. Eine Interaktion konnte gleichermaßen für die Fragmente FYRC_B3 und FYRN_A3 nachgewiesen werden (Reihe 3), die ebenfalls gemeinsam an den Nukleoli detektiert werden konnten. Die Spezifität ist auch hier durch die entsprechende Kontrollen garantiert (vgl. Abb. 3-15 und 3-16 jeweils Reihe 3). Anders verhält es sich in den Interaktionsanalysen der Fragmente FYRC_B1 mit FYRN_A1, sowie FYRC_B6 mit FYRN_A6. Obwohl sich auch hier eine Co-Lokalisierung der potentiellen Interaktionsdomänen zeigte (obere Reihe bzw. untere Reihe), konnte die Interaktion aufgrund der Resultate der durchgeführten Kontrollexperimente nicht bewiesen werden (vgl. Abb. 3-16 obere bzw. untere Reihe). Trotzdem zeigt ein Vergleich der Kontrollexperimente und der Interaktionsanalysen einige Unterschiede auf: bei den Kontroll-Transfektionen befindet sich noch sehr viel GFP diffus im Zellkern, während bei Co-Transfektion mit dem entsprechenden MLL Fragment das gesamte GFP an den Nukleoli zurückgehalten wird. Dies spricht für eine stärkere Interaktion mit dem Rev-BFP-Fusionsprotein (FYRN_A1-BFP bzw. FYRN_A6-BFP) im Vergleich zum Rev-BFP Protein alleine. Hinzukommt, dass die verschiedenen Rev-BFP Fusionsproteine etwas schwächer exprimiert werden als das Rev-BFP alleine. Eine Interaktion der Fragmente FYRC_B1 mit FYRN_A1 sowie FYRC_B6 mit FYRN_A6 ist somit möglich, konnte aber nicht stichhaltig bewiesen werden konnte.

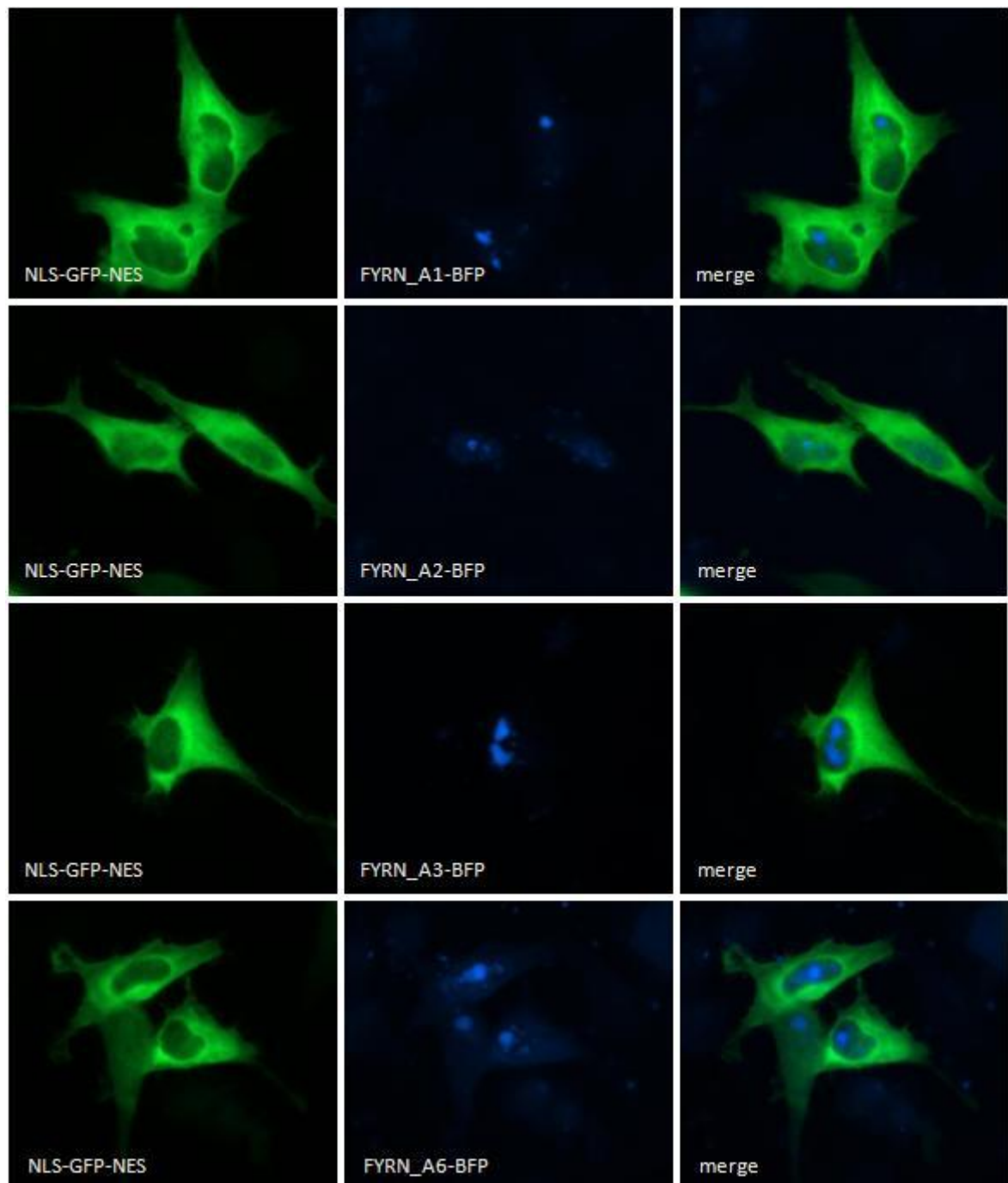


Abbildung 3-15: Mikroskopische Analyse der Kontroll-Transfektionen der N-terminalen MLL Fragmente FYRN_A1, FYRN_A2, FYRN_A3 und FYRN_A6 mit dem Leervektor p3-NLS-GFP/GST-NES in HeLa Zellen. Obere Reihe: FYRN_A1-BFP mit NLS-GFP-NES; Reihe 2: FYRN_A2-BFP mit NLS-GFP-NES; Reihe 3: FYRN_A3-BFP mit NLS-GFP-NES; untere Reihe: FYRN_A6-BFP mit NLS-GFP-NES. Die Markerproteine GFP und BFP sind stets getrennt lokalisiert.

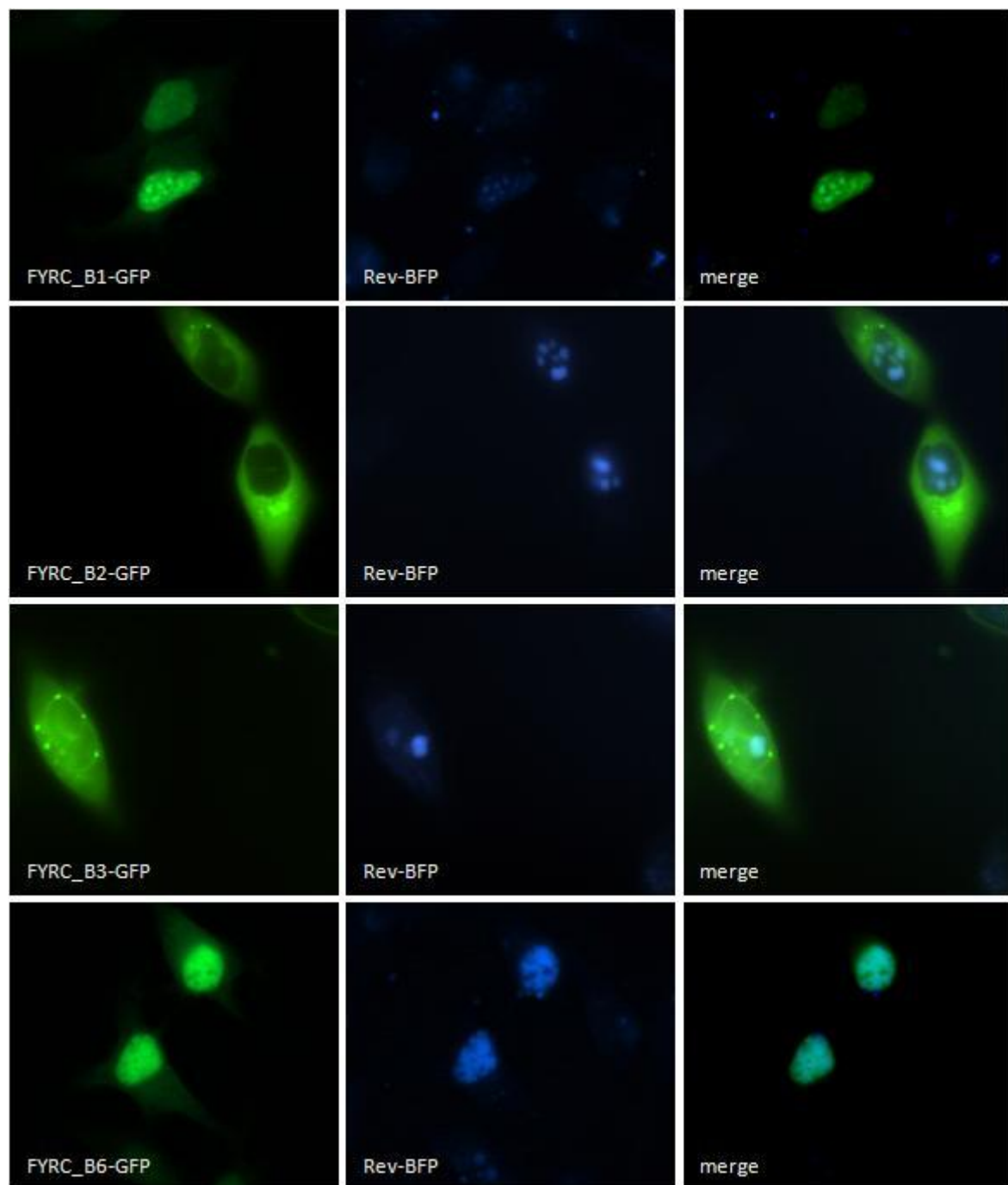


Abbildung 3-16: Mikroskopische Analyse der Kontroll-Transfektionen der C-terminalen MLL Fragmente FYRC_B1, FYRC_B2, FYRC_B3 und FYRC_B6 mit dem Leervektor pc3-RevM10BL-BFP in HeLa Zellen. Obere Reihe: FYRC_B1-GFP mit Rev-BFP; Reihe 2: FYRC_B2-GFP mit Rev-BFP; Reihe 3: FYRC_B3-GFP mit Rev-BFP; untere Reihe: FYRC_B6-GFP mit Rev-BFP. Die Fragmente FYRC_B1 sowie FYRC_B6 zeigen eine nukleoläre Lokalisation und demzufolge eine Blind-Interaktion mit dem Rev-BFP Markerprotein. Die Fragmente FYRC_B2 und FYRC_B3 hingegen zeigen eine deutliche cytoplasmatische Lokalisation.

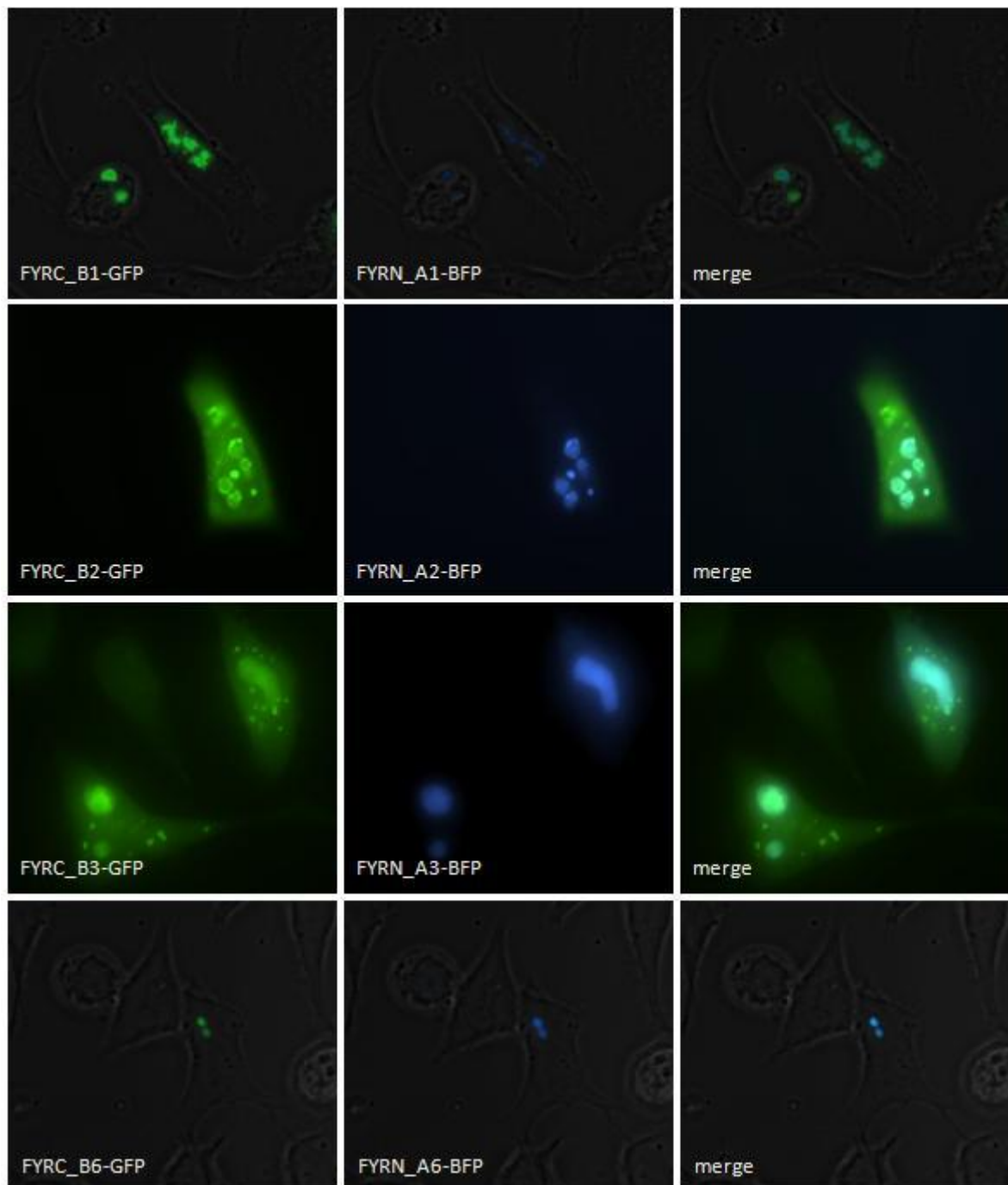


Abbildung 3-17: Mikroskopische Analyse des Interaktionstest der MLL Fragmente FYRC_B1, FYRC_B2, FYRC_B3 bzw. FYRC_B6 mit FYRN_A1, FYRN_A2, FYRN_A3 bzw. FYRN_A6 in HeLa Zellen. Obere Reihe: FYRC_B1-GFP mit FYRN_A1-BFP; Reihe 2: FYRC_B2-GFP mit FYRN_A2-BFP; Reihe 3: FYRC_B3-GFP mit FYRN_A3-BFP; untere Reihe: FYRC_B6-GFP mit FYRN_A6-BFP. Bei allen Versuchen ist eine Translokation des GFP Fusionsproteins an die Nukleoli zu beobachten. Bei Co-Expression von FYRC_B2-GFP mit FYRN_A2 sowie FYRC_B3-GFP mit FYRN_A3-BFP ist die Umlagerung nicht vollständig.

Analyse verschiedener Fragment-Kombinationen

Um die potentielle Interaktionsstruktur genauer zu beleuchten, wurden im Folgenden alle erzeugten Fragmente, welche nicht bereits mit dem entsprechenden Kontrollplasmid eine Interaktion zeigten, untereinander auf eine Interaktion hin untersucht. Trifft die aufgestellte Hypothese bezüglich der Interaktionsdomäne zu, so sollten die verschiedenen Fragmente untereinander (beispielsweise FYRN_A1 mit FYRC_B2) keine Interaktion mehr aufweisen. In Tabelle 3-3 sind die Ergebnisse der Interaktionstests zusammengefasst.

Tabelle 3-3: Ergebnisse der Interaktionsanalysen der verschiedenen MLL Fragmente

Fragment 1	Fragment 2	Auswertung
FYRN_A1-BFP	FYRC_B2-GFP	keine Interaktion
FYRN_A1-BFP	FYRC_B3-GFP	keine Interaktion
FYRN_A2-BFP	FYRC_B3-GFP	keine Interaktion
FYRN_A3-BFP	FYRC_B2-GFP	keine Interaktion
FYRN_A6-BFP	FYRC_B2-GFP	keine Interaktion
FYRN_A6-BFP	FYRC_B3-GFP	keine Interaktion

Wie aus der Tabelle zu entnehmen ist, zeigten die getesteten MLL Fragmente untereinander keine Interaktion mehr. Dieses Ergebnis bekräftigt die generierte hypothetische Interaktionsstruktur.

Weitere Aufteilung der Interaktionsdomänen FYRN_A3 und FYRC_B3

Bis zu diesem Zeitpunkt waren die kleinsten MLL Abschnitte, welche weiterhin miteinander interagieren konnten, die Fragmente FYRN_A3 mit einer Länge von 58 AS und FYRC_B3 mit einer Länge von 56 AS. Bei Betrachtung der mit dem FYRC_B3 Fragment transfizierten Zellen wurde eine ungewöhnliche Akkumulation des GFP Markerproteins beobachtet (vgl. Abb. 3-16 und 3-17, je Reihe 3, linkes Bild). Auch bei Co-Transfektionen mit N-terminalen Fragmenten (siehe Tabelle 3-3) war diese Akkumulation zu sehen (Bilder nicht gezeigt). Es sei erwähnt, dass ähnliche Ansammlungen teilweise bei Transfektionen des FYRC_B2 Fragments detektiert wurden (siehe Abb. 3-16 Reihe 2, links). Dies ist damit zu erklären, dass dieses Proteinfragment das gesamte FYRC_B3 Fragment beinhaltet. Da die Versuche mit der Intention

durchgeführt wurden, ein MLL Fragment zu identifizieren, welches möglicherweise in der Lage ist, mit der Interaktion der beiden MLL *full length* Proteinfragmente MLL_C und MLL_N zu interferieren, war diese Beobachtung äußerst interessant. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Akkumulation des GFP durch Interaktion des fusionierten FYRC_B3 Fragments mit dem nativen endogenen MLL Protein zustande kommt. Im nächsten Schritt wurde daher das FYRC_B3 Fragment sowie der N-terminale Gegenpart FYRN_A3 erneut in zwei einzelne Proteinfragmente geteilt (siehe Abbildung 3-18). Es sollte untersucht werden, ob diese weiterhin in der Lage sind, sowohl miteinander als auch mit den größeren Fragmenten zu interagieren.

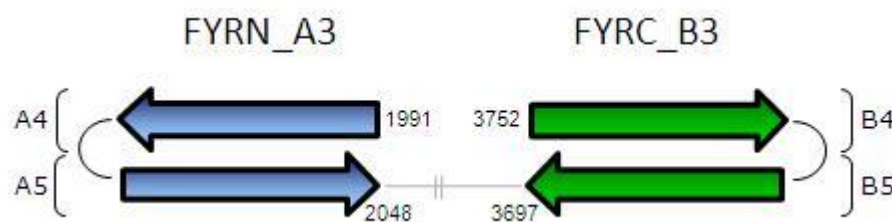


Abbildung 3-18: Schematische Darstellung der MLL Fragmente FYRN_A3 und FYRC_B3. Blaue Blockpfeile: N-terminaler Interaktionsbereich des MLL Proteins. Grüne Blockpfeile: C-terminaler Interaktionsbereich des MLL Proteins. Für weitere Interaktionsstudien wurde das FYRN_A3 Fragment in die Fragmente FYRN_A4, AS 1991 – 2018, und FYRN_A5, AS 2019 – 2048, aufgeteilt. Das FYRC_B3 Fragment wurde in die Fragmente FYRC_B4, AS 3697 – 3725, und FYRC_B5, AS 3726 – 3752, unterteilt. ||: CSI und CSII.

Auch für diese Klonierung mussten die zugehörigen cDNAs mittels PCR unter Verwendung geeigneter Oligonukleotide amplifiziert werden. Als Template wurden die zuvor generierten Plasmide eingesetzt. Nach Überprüfung der korrekten Integration sowie Bestätigung der fehlerfreien Sequenz durch Restriktionsverdau bzw. Sequenzierungsreaktion, konnten die erhaltenen Plasmide für die Interaktionsversuche verwendet werden (siehe Abbildung 3-19).

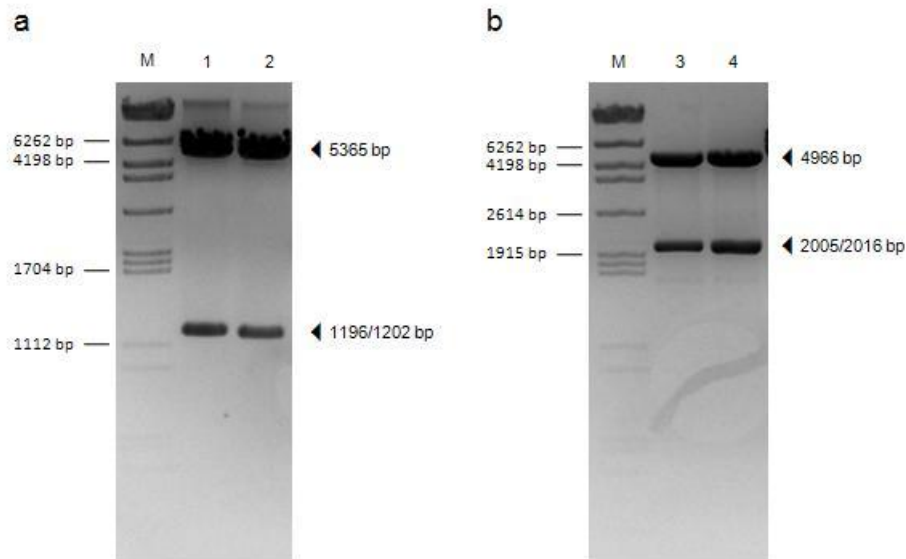


Abbildung 3-19: Restriktionsverdau der klonierten Plasmide für das PTB-System (IV). a) pc3-FYRN_A4-BFP (Spur 1) und pc3-FYRN_A5-BFP (Spur 2) mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *XbaI*. b) p3-GFP-FYRC_B4 (Spur 3) und p3-GFP-FYRC_B5 (Spur 4) mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *EcoRV*. Größen der Markerbanden (M) sowie die Größen der durch Restriktionsverdau erhaltenen Fragmente (◄) sind angegeben.

Zusammen mit den Interaktionsversuchen wurden die nötigen Kontroll-Transfektionen durchgeführt. HeLa Zellen wurden hierfür mit den verschiedenen Plasmid Kombinationen co-transfiziert. Die Ergebnisse der Kontroll-Transfektionen sind in Abbildung 3-20 dargestellt, die Resultate der Interaktionsversuche sind in Abbildung 3-21 gezeigt.

Die Auswertung der Kontroll-Transfektionen zeigte für die beiden neuen N-terminalen MLL Proteinfragmente FYRN_A4 und FYRN_A5 eine getrennte Lokalisation der Markerproteine BFP und GFP (siehe Abbildung 3-20 a). Demnach konnten diese beiden Fragmente ohne weiteres für die Interaktionsanalysen verwendet werden. Gleiches galt für das C-terminale MLL Proteinfragment FYRC_B5, auch hier waren die Markerproteine deutlich unabhängig voneinander detektierbar. Hingegen kam es bei der Kontroll-Transfektion des zweiten C-terminalen Fragments FYRC_B4 zu einer partiellen Translokation des Fusionsproteins an die Nukleoli der Zelle. Dies spricht für eine (schwache) Blind-Interaktion mit dem Rev-BFP Markerprotein, so dass Interaktionsversuche mit diesem Fragment keine eindeutigen Aussagen liefern konnten. Trotzdem wurden auch mit diesem Fragment Interaktionsversuche durchgeführt.

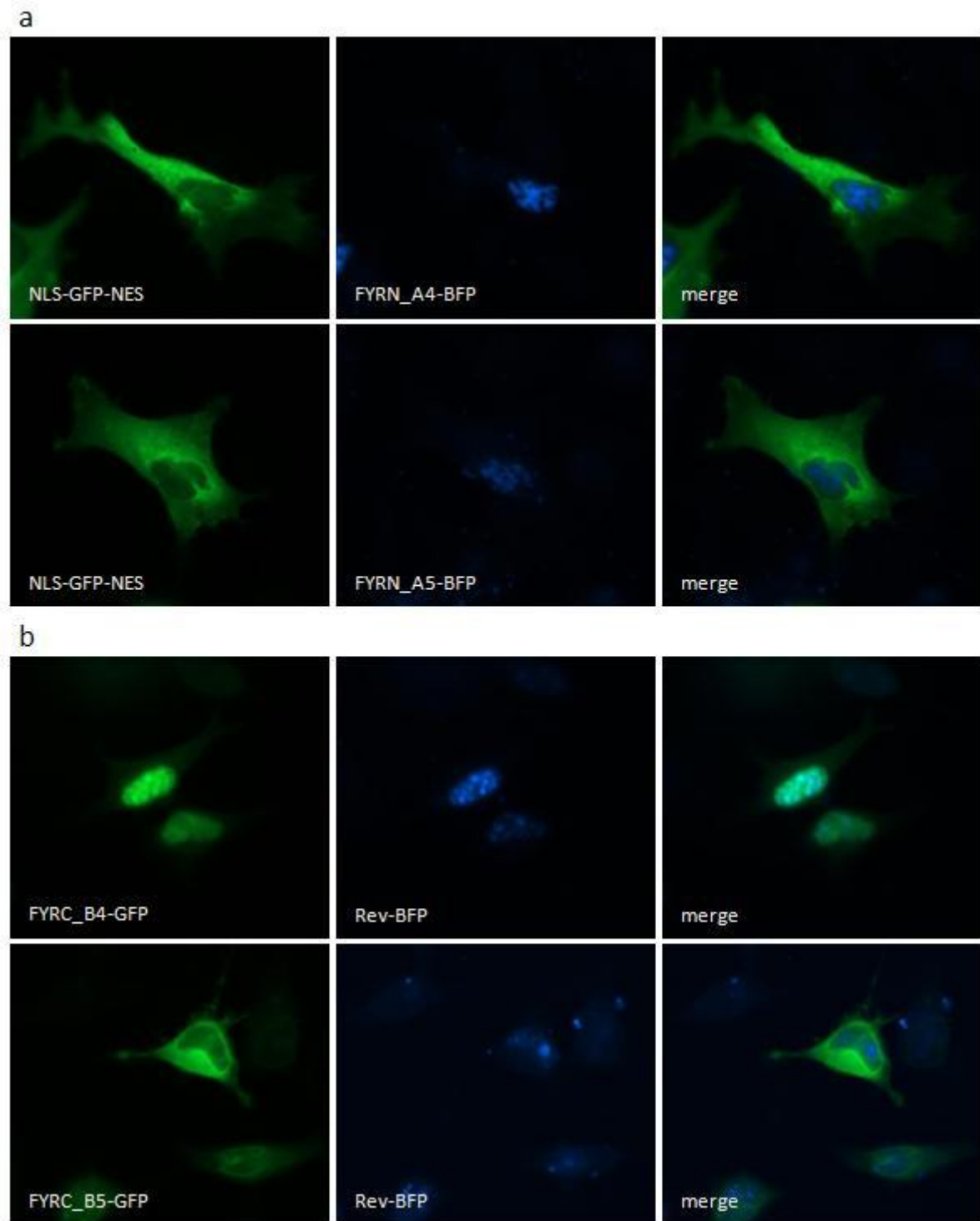
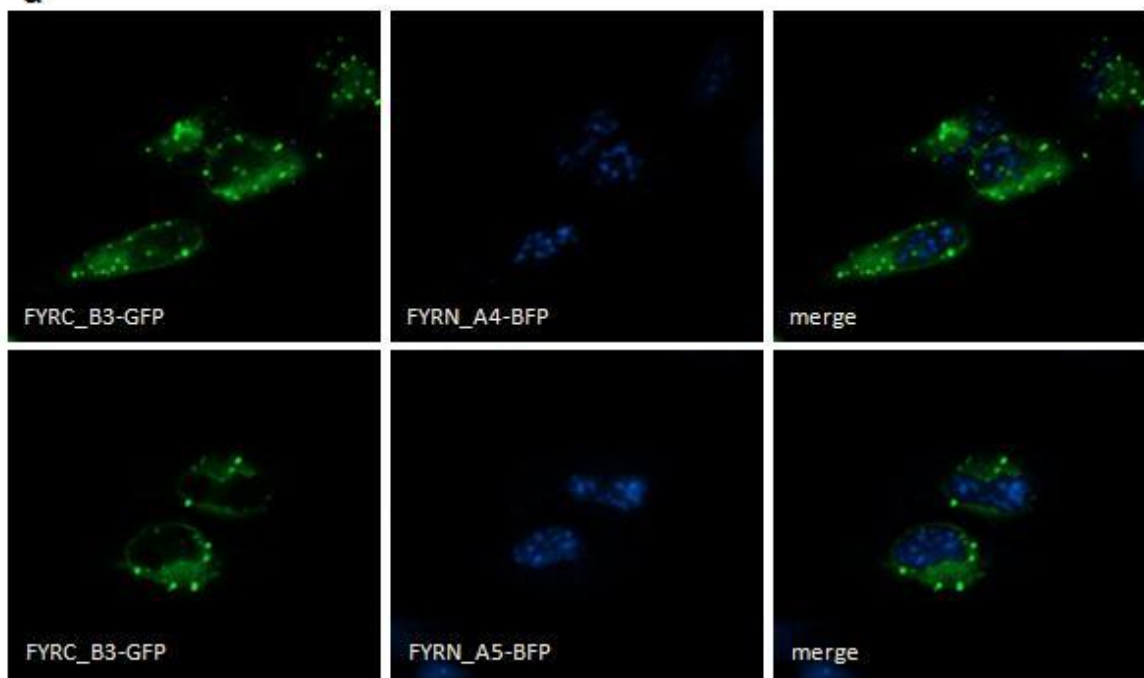


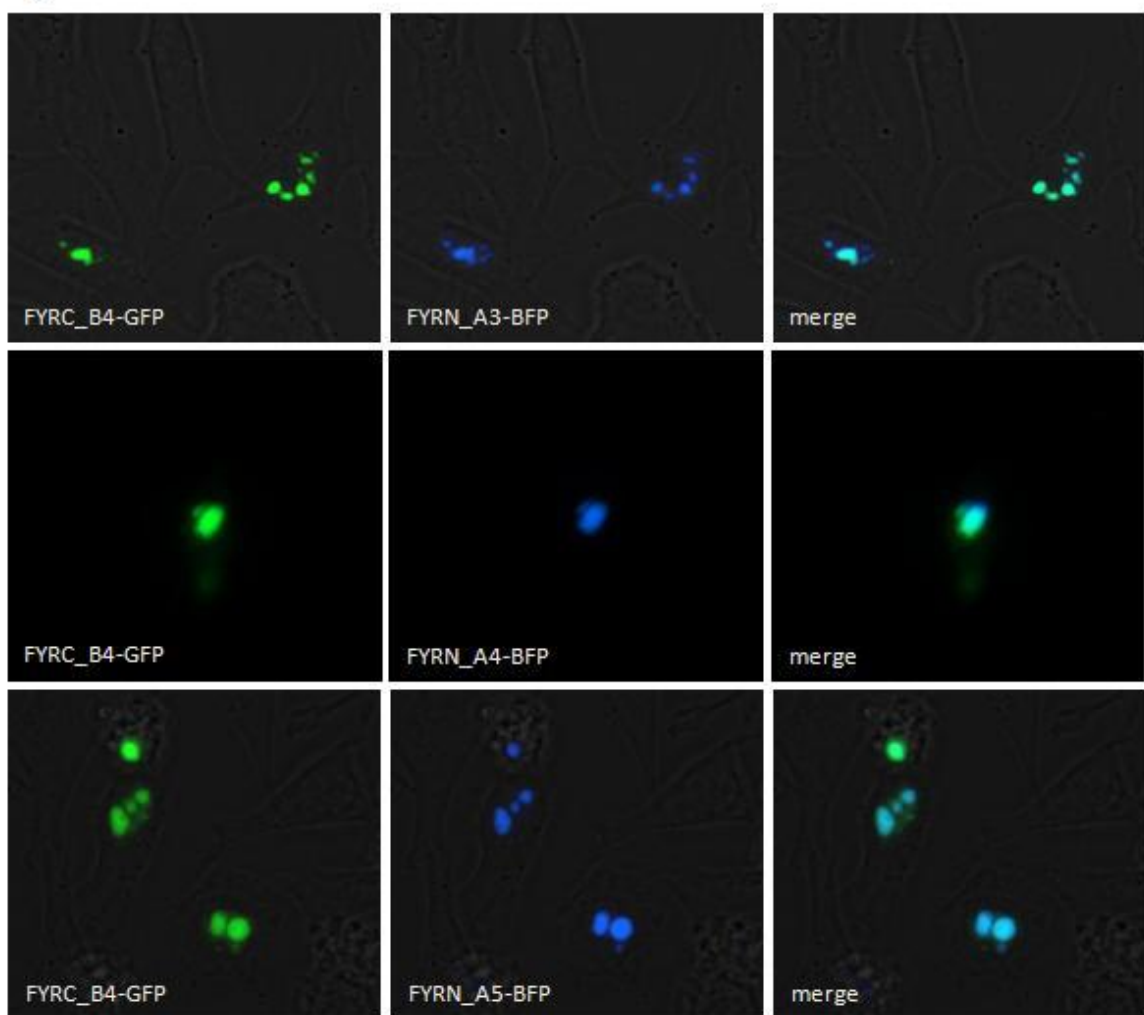
Abbildung 3-20: Mikroskopische Analyse der Kontroll-Transfektionen der MLL Fragmente FYRN_A4, FYRN_A5, FYRC_B4 sowie FYRC_B5 mit dem Vektor pc3-RevM10BL-BFP. a) Obere Reihe: FYRN_A4-BFP mit NLS-GFP-NES; untere Reihe: FYRN_A5-BFP mit NLS-GFP-NES. Die Markerproteine weisen eine getrennte Lokalisation auf. b) Obere Reihe: FYRC_B4 mit Rev-BFP; untere Reihe: FYRC_B5 mit Rev-BFP. Das FYRC_B4 Fragment zeigt eine Co-Lokalisation und damit eine Blind-Interaktion mit Rev-BFP. Im Falle des FYRC_B5 Fragments weisen die Markerproteine eine unabhängige Lokalisation auf.

Die Auswertung der Co-Transfektionen ergab folgende Ergebnisse. Die verkürzten N-terminalen Fragmente FYRN_A4 und FYRN_A5 waren nicht mehr in der Lage, mit dem C-terminalen Proteinfragment FYRC_B3 zu interagieren (siehe Abb. 3-20 a). Bei Co-Transfektion dieser N-terminalen Abschnitte mit den Fragmenten FYRC_B4 und FYRC_B5 hingegen konnte eine Co-Lokalisation beobachtet werden (siehe Abb. 3-20 b und c). Im Fall des FYRC_B4 Fragments wurde bereits eine schwache Blind-Interaktion mit dem Markerprotein Rev-BFP nachgewiesen. Es ist demnach nicht auszuschließen, dass die Translokation des GFP Markerproteins ausschließlich auf der nachgewiesenen Blind-Interaktion beruht. Bei direktem Vergleich der Fluoreszenzbilder war jedoch klar erkennbar, dass bei Co-Transfektion mit den MLL Fragmenten eine stärkere Umlagerung des GFP Markerproteins an die Nukleoli stattfindet, als es bei den Kontroll-Transfektionen der Fall ist (vgl. Abb. 3-20 b und Abb. 3-19 b oben). Eine Interaktion ist demnach wahrscheinlich, jedoch nicht eindeutig nachweisbar. Die Interaktion von FYRC_B5 mit FYRN_A4, FYRN_A5 und FYRN_A3 kann unter Betrachtung der zugehörigen Kontrollen als spezifisch und eindeutig beschrieben werden (siehe Abb. 3-20 c). Vergleicht man den Grad der Umlagerung des GFP Markerproteins bei diesen Co-Transfektionen mit der Umlagerungsintensität bei Co-Transfektion von FYRC_B3 mit FYRN_A3 (vgl. Abb. 3-16), so wird deutlich, dass im Falle des FYRC_B5 Proteinfragments keine komplette Umlagerung mehr stattgefunden hat. Dies deutet auf eine schwächere Interaktion der verschiedenen Proteinfragmente mit FYRC_B5 hin.

a



b



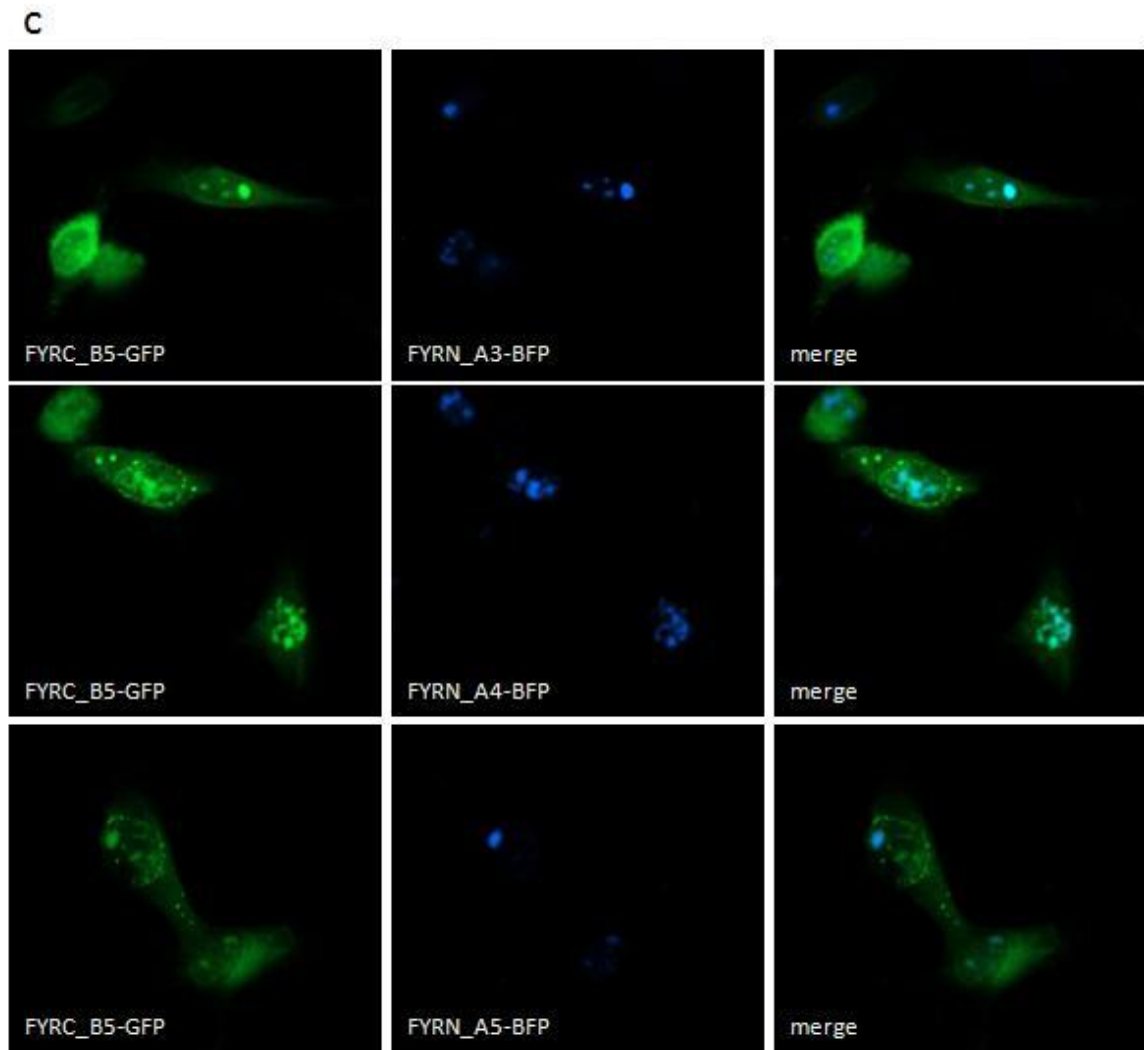


Abbildung 3-21: Mikroskopische Analyse der Interaktionstests der MLL Fragmente FYRC_B3, FYRC_B4, FYRC_B5 mit FYRN_A3, FYRN_A4 und FYRN_A5 in HeLa Zellen. a) Obere Reihe: FYRC_B3-GFP mit FYRN_A4-BFP; untere Reihe: FYRC_B3-GFP mit FYRN_A5-BFP. Keines der beiden Fragmente bewirkt eine Translokation des GFP Fusionsproteins. b) Obere Reihe: FYRC_B4-GFP mit FYRN_A3-BFP; mittlere Reihe: FYRC_B4-GFP mit FYRN_A4-BFP; untere Reihe: FYRC_B4-GFP mit FYRN_A5-BFP. Vollständige Translokation des GFP Fusionsproteins bei allen 3 Interaktionsanalysen (jedoch bereits Blind-Interaktion mit Kontrollplasmid). c) Obere Reihe: FYRC_B5-GFP mit FYRN_A3-BFP; mittlere Reihe: FYRC_B5-GFP mit FYRN_A4-BFP; untere Reihe: FYRC_B5-GFP mit FYRN_A5-BFP. In allen drei Fällen besteht eine Co-Lokalisation der Markerproteine.

In Tabelle 3-4 sind die Ergebnisse aller durchgeführten Co-Transfektionen zusammengefasst. Die Darstellung berücksichtigt beobachtete Blind-Interaktionen mit den Kontrollvektoren. In einigen Fällen zeigten Proteinfragmente, welche bereits bei den Kontrollversuchen eine Interaktion aufwiesen, eine stärkere Umlagerung des GFP

Markerproteins, sobald die Co-Transfektion mit einem anderen MLL Fragment durchgeführt wurde. In diesen Fällen kann von einer Interaktion der beteiligten Fragmente ausgegangen werden, jedoch bedarf es für definitive Aussagen einer anderen Nachweismethode.

Tabelle 3-4: Ergebnisse aller Interaktionsanalysen. +: Interaktion der getesteten Proteinfragmente ohne vollständige Translokation des GFP Fusionsproteins; +++: Interaktion der getesteten Proteinfragmente mit vollständiger Translokation des GFP Fusionsproteins. (+): Interaktion der getesteten Proteinfragmente bei bekannter Blind-Interaktion, Translokationsgrad des GFP Fusionsproteins entsprechend (keine vollständige Translokation); (+++): Interaktion der getesteten Proteinfragmente bei bekannter Blind-Interaktion, stärkere (vollständige) Translokation des GFP Fusionsproteins; BI: Blind-Interaktion; n.a.: nicht analysiert.

Fragmente	GFP	FYRC_B1	FYRC_B2	FYRC_B3	FYRC_B4	FYRC_B5	FYRC_B6
BFP	–	BI	–	–	BI	–	BI
FYRN_A1	–	(+++)	–	–	n.a.	–	(+++)
FYRN_A2	–	(+)	+++	–	n.a.	+	(+++)
FYRN_A3	–	(+++)	–	+++	(+++)	+	(+)
FYRN_A4	–	n.a.	–	–	(+++)	+	n.a.
FYRN_A5	–	n.a.	–	–	(+++)	+	(+)
FYRN_A6	–	(+++)	–	–	n.a.	+	(+++)

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass es gelungen ist, die internen Interaktionsbereiche des MLL Proteins deutlich zu verkleinern. Die offensichtlichen Gegensätze der beiden vorliegenden Publikationen konnten bereits durch die ersten Ergebnisse des B2H-Systems ausgeräumt werden. Im Folgenden konnten die Interaktionsdomänen auf einen Bereich von 58 AS im N-Terminus und auf 56 AS im C-Terminus des MLL Proteins eingegrenzt werden (FYRN_A3 von AS 1991 – 2048 bzw. FYRC_B3 von AS 3697 – 3752). Die Interaktion kürzerer MLL Fragmente scheint schwächer zu werden, so dass die zusätzlichen Bereiche vermutlich stabilisierende Auswirkungen auf die Interaktion haben. Da eine stabile Interaktion Voraussetzung für

eine potentielle Inhibition der intramolekularen Proteininteraktion darstellt, bedeutet eine weitere Verkleinerung der Fragmente keinen weiteren Fortschritt.

Die neu definierten minimalen Interaktionsdomänen des MLL Proteins sind in Abbildung 3-22 dargestellt.

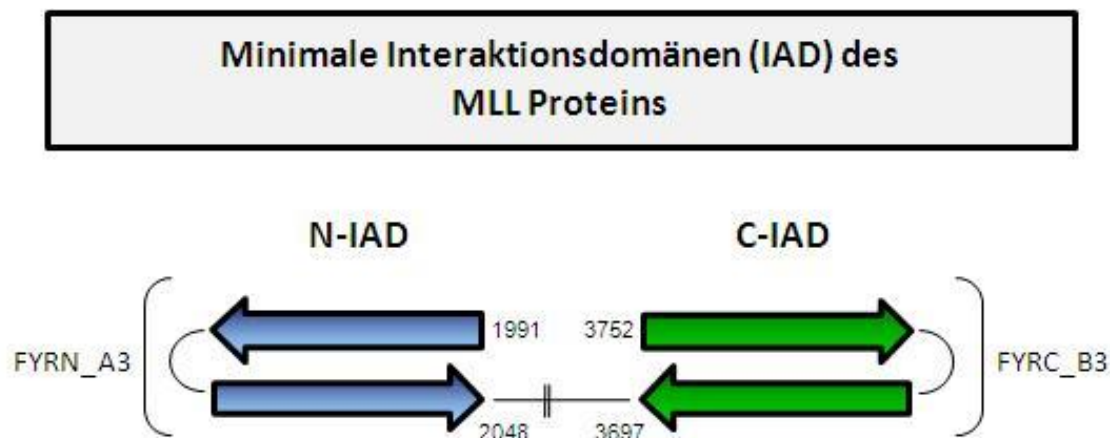


Abbildung 3-22: Ergebnis der Interaktionsanalyse. Minimales Interaktionsinterface des MLL Proteins. Blaue Blockpfeile: minimale N-terminale Interaktionsdomäne FYRN_A3, AS 1991 – 2048. Grüne Blockpfeile: minimale C-terminale Interaktionsdomäne FYRC_B3, AS 3697 – 3752.

3.3 Auffälligkeiten während der Interaktionsstudien - Folgeversuche

Während der Durchführung der Interaktionsanalysen wurden einige interessante Beobachtungen gemacht. Wie bereits erwähnt, konnte eine ungewöhnliche Akkumulation des GFP Markerproteins beobachtet werden, sobald eine Fusion mit dem FYRC_B3 Fragment vorlag. Entsprechende Ansammlungen kamen bei Transfektion mit den Fragmenten FYRC_B2 sowie FYRC_B5 vor. Diese Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass diese Fragmente mit dem *full length* MLL Protein interagieren und es damit zur beschriebenen Akkumulation kommt. Diese Hypothese wurde im zweiten Schritt der Arbeit untersucht.

Eine weitere Auffälligkeit bestand darin, dass sich bei einigen Transfektionen (in Abhängigkeit des verwendeten Plasmids) nach einer gewissen Zeit eine Vielzahl der Zellen stark abrundeten und in der Folge ablösten. Dies ist ein Anzeichen dafür, dass die Zellen durch die transfizierten Plasmide einen undefinierten Schaden erleiden. Dementsprechend bestand eine weitere Aufgabe darin, die letalen Auswirkungen der verschiedenen MLL Proteinfragmente auf unterschiedliche Zelltypen zu untersuchen.

3.3.1 Interaktionsanalyse des Fragments FYRC_B3 mit den *full length* Proteinen MLL sowie AF4/MLL

In diesem Teil der Arbeit sollte ein Nachweis für die Interaktion des minimierten C-terminalen MLL Proteinfragments FYRC_B3 mit den *full length* Proteinen MLL und AF4/MLL erbracht werden. Zwar konnte auch für das kleinere FYRC_B5 Fragment eine Interaktion mit verschiedenen N-terminalen MLL Proteinfragmenten nachgewiesen werden, diese schien jedoch im Vergleich zur Interaktion des FYRC_B3 Fragments deutlich schwächer zu sein, da keine komplette Umlagerung des GFP Markerproteins an die Nukleoli beobachtet werden konnte. Die Vermutung lag nahe, dass die Interaktion mit den *full length* Proteinen in gleichem Maße vermindert sein würde. Aus diesem Grund wurden die folgenden Interaktionsversuche mit dem FYRC_B3 Fragment durchgeführt.

Zum Nachweis der Interaktion mit den *full length* Proteinen wurden zwei verschiedene experimentelle Ansätze geplant. Zum einen sollte die Interaktion mittels Co-Immunopräzipitationsversuchen bestätigt werden, zum anderen sollte selbige nach Transfektion und Fixierung der Zellen mittels Fluoreszenz-Mikroskopie sichtbar gemacht werden.

Co-Immunopräzipitationen

Für die Durchführung der Co-Immunopräzipitationen wurden Plasmide mit den kodierenden Sequenzen der zu untersuchenden Fragmente benötigt. Die Versuche wurden in humanen 293T Zellen durchgeführt, da diese sich in der Vergangenheit in unserem Labor für Co-Präzipitationsexperimente als geeignet erwiesen. Durch die kommerzielle Verfügbarkeit eines GFP Antikörpers konnte der zuvor generierte Vektor p3-GFP-FYRC_B3 des zellbasierten PTB-Systems auch für diese Untersuchungen eingesetzt werden. Die cDNA Sequenz des MLL Proteins wurde in den für Säugerzellen optimierten Expressionsvektor pTARGET eingebracht, der eine hohe, konstitutive Expression des Proteins erlaubt. Dieser Vektor wurde bereits früher in unserem Labor modifiziert, so dass nach Insertion eines *SfiI*-Linkers (pTARGET Δ *SfiI*-XSSSCA, siehe Abbildung 3-23) die Klonierung der *SfiI*-mobilisierbaren cDNA Kasette des *MLL* Gens möglich war.

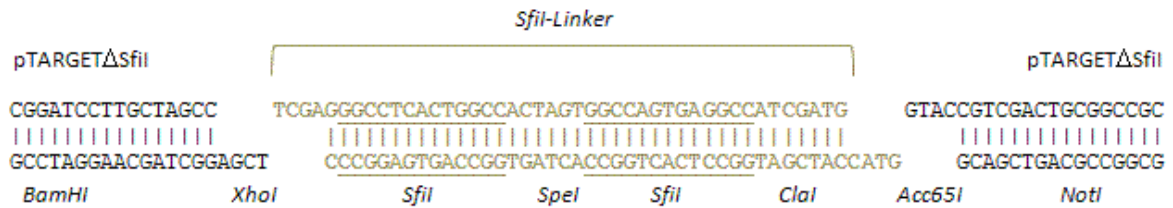


Abbildung 3-23: Schematische Darstellung des *SfiI*-Linkers. Einführung des Linkers in pTARGETΔ*SfiI* über die Restriktionsschnittstellen *XhoI* und *Acc65I*. Der Linker ermöglicht durch das Vorhandensein zweier verschiedener *SfiI* Erkennungssequenzen die gerichtete Klonierung der MLL bzw. der4 cDNA Kasette, welche mit entsprechenden Schnittstellen ausgestattet sind.

Für die Co-Immunopräzipitationsversuche mit dem AF4/MLL Protein stand bereits ein entsprechender Vektor, pTARGETΔ*SfiI*-der4, zur Verfügung. Nach Kontrolle des neu generierten Vektors pTARGETΔ*SfiI*-MLL (siehe Abb. 3-24) konnten die Co-Immunopräzipitationen durchgeführt werden.

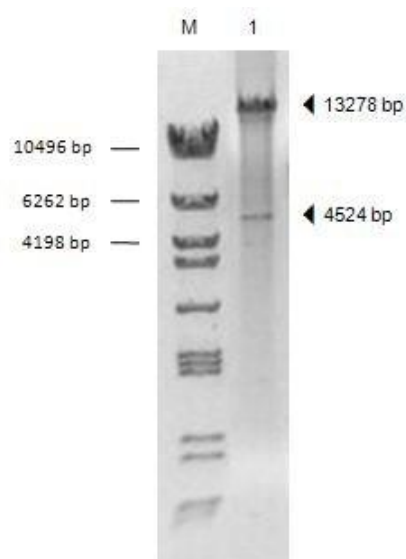


Abbildung 3-24: Restriktionsverdau des Vektors pTARGETΔ*SfiI*-MLL (Spur 1) mit dem Restriktionsenzym *AvrII*. Größen der Markerbanden (M) sowie die Größen der durch Restriktionsverdau erhaltenen Fragmente (◄) sind angegeben.

293T Zellen wurden jeweils mit dem FYRC_B3 Fragment und mit den Expressionsvektoren der *full length* Proteine MLL bzw. AF4/MLL co-transfiziert. Als Kontrolle wurden zusätzlich 293T Zellen mitgeführt, welche mit dem Leervektor p3-NLS-GFP/GST-NES sowie dem MLL bzw. AF4/MLL exprimierenden Vektor co-transfiziert wurden. Auf diese

Weise konnte eine unspezifische Interaktion des GFP/GST Anteils mit den *full length* Proteinen ausgeschlossen werden. Zur Immunopräzipitation des MLL Proteins wurde ein monoklonaler MLL Antikörper, anti-MLL27.1, verwendet, welcher spezifisch ein Epitop innerhalb des MLL-N-Terminus detektiert. Die Immunopräzipitation des AF4/MLL Proteins erfolgte unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers anti-AF4_N, welcher den N-terminalen Bereich des AF4 Proteins erkennt. Im Anschluss an die Co-Immunopräzipitation wurden die erhaltenen Proben unter Verwendung eines GFP spezifischen Antikörpers auf einem Immunoblot analysiert. Als Positiv-Kontrolle wurde jeweils das Zelllysate von p3-GFP-FYRC_B3 transfizierten Zellen mit aufgetragen (Abbildung 3-25 a und b, Spur: +). Um eine Kreuzreaktion des GFP Antikörpers mit unspezifischen Proteinen auszuschließen, wurde ebenfalls das Zelllysate untransfizierter Zellen untersucht (Abbildung 3-25 c).

Die Resultate zeigen deutlich, dass sowohl mit dem MLL Protein als auch mit dem AF4/MLL Protein das FYRC_B3 Fragment co-immunopräzipitiert werden konnte (Abbildung 3-25 a und b, rechter Blot). Die analogen Versuche mit dem Leervektor p3-NLS-GFP/GST-NES zeigten keine Interaktion, da weder mit dem MLL Protein noch mit dem AF4/MLL Protein der GFP/GST Anteil co-präzipitiert wurde (Abbildung 3-25 a und b, linker Blot). Eine Kreuzreaktion des GFP Antikörpers mit unspezifischen Proteinen der 293T Zellen konnte durch Analyse der untransfizierten Kontroll-Zellen ausgeschlossen werden (Abbildung 3-25 c). Demnach gilt eine Interaktion des verwendeten Fragments FYRC_B3 mit beiden *full length* Proteinen als erwiesen.

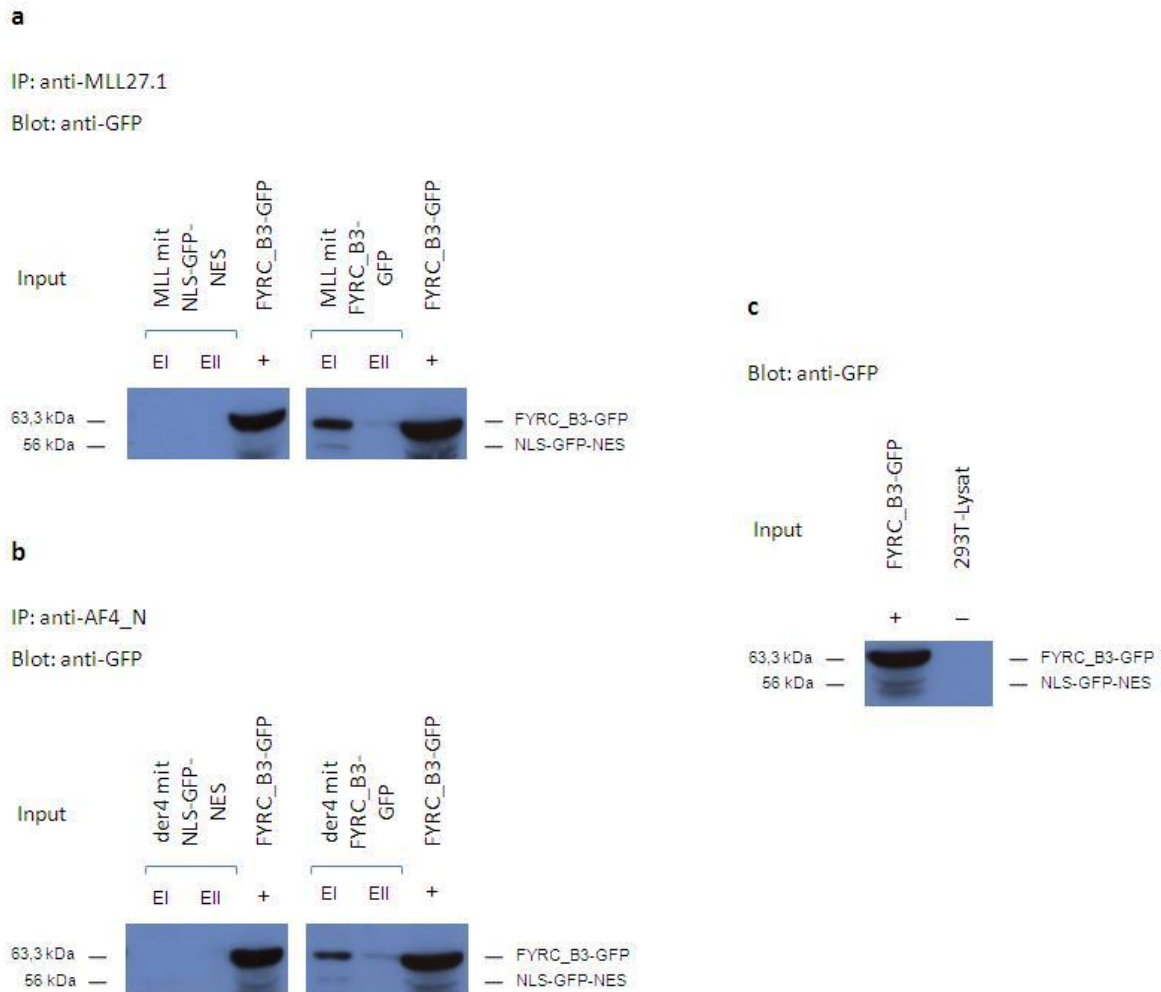


Abbildung 3-25: Immunoblotanalysen der Co-Immunopräzipitationsversuche. a) Immunopräzipitation mit α -MLL27.1 an Zelllysaten nach Co-Expression von MLL + NLS-GFP-NES bzw. MLL + FYRC_B3-GFP (linker bzw. rechter Blot). Zelllysate nach Expression von FYRC_B3-GFP dient als Positiv-Kontrolle. Detektion der Fragmente durch Verwendung des α -GFP Antikörpers. b) Immunopräzipitation mit α -AF4_N an Zelllysaten nach Co-Expression von der4 + NLS-GFP-NES bzw. der4 + FYRC_B3-GFP (linker bzw. rechter Blot). Zelllysate nach Expression von FYRC_B3-GFP dient als Positiv-Kontrolle. Detektion der Fragmente durch Verwendung des α -GFP Antikörpers. c) Analyse untransfizierter 293T Zellen zum Ausschluss unspezifischer Reaktionen des α -GFP Antikörpers. Positiv-Kontrolle: Zelllysate nach Expression von FYRC_B3-GFP.

Interaktionsanalyse mittels Fluoreszenz-Mikroskopie

Der zweite experimentelle Ansatz zum Nachweis einer Interaktion des FYRC_B3 Fragments mit den Proteinen MLL und AF4/MLL basierte erneut auf einer Analyse per Fluoreszenz-Mikroskopie. Zu diesem Zweck sollten MLL bzw. AF4/MLL Proteine erzeugt werden, welche sowohl an ihrem N-Terminus als auch an ihrem C-Terminus mit einem

Fluoreszenzprotein fusioniert sind. Durch Co-Transfektion dieser Konstrukte mit dem vorhanden p3-GFP-FYRC_B3 Plasmid sollte die Interaktion durch Co-Lokalisation der verschiedenen Fluoreszenzproteine bestätigt werden. Zusätzlich sollten diese Versuche die Möglichkeit bieten, potentielle Auswirkungen der Interaktion auf Lokalisation und Abundanz der nativen Proteinfragmente festzustellen.

Klonierung der doppelt-farbmarkierten MLL bzw. AF4/MLL Konstrukte

Für die Fluoreszenz-mikroskopischen Analysen wurde ebenfalls der Expressionsvektor pTARGET ausgewählt. Die Klonierung wurde in der Art durchgeführt, dass der N-Terminus der Proteine mit dem mCherry Markerprotein fusioniert ist, während sich am C-terminalen Ende das BFP befindet (siehe Abbildung 3-26). Werden die Proteine innerhalb der Zelle durch die Protease Taspase1 prozessiert, kann die Lokalisation der N-Termini anhand des mCherry Proteins und die Lokalisation der C-Termini anhand des BFP bestimmt werden.

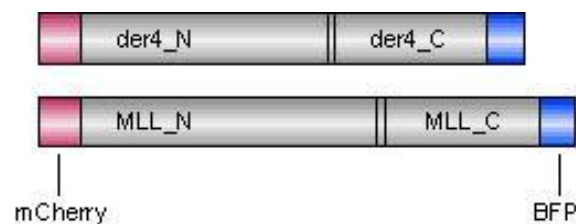


Abbildung 3-26: Schematische Darstellung der doppelt-farbmarkierten Proteine MLL und AF4/MLL (der4).
 II: CS1 und CS2. N-Termini der Proteine sind an das mCherry Markerprotein fusioniert, C-Termini der Proteine sind an das BFP Markerprotein fusioniert.

Um die gewünschten Konstrukte zu erhalten, mussten im ersten Klonierungsschritt die kodierenden Sequenzen der Fluoreszenzproteine in den zuvor generierten Vektor pTARGET Δ Sfi-XSSSCA (siehe Abbildung 3-23) eingebracht werden. Nach Amplifikation der cDNAs mit entsprechenden Oligonukleotiden erfolgte die Klonierung der *BFP* cDNA über die Restriktionsschnittstellen *Acc65I* und *NotI*, was letztendlich in der gewünschten Fusion des BFP mit dem C-terminalen Ende des MLL bzw. AF4/MLL Proteins resultierte. Die Klonierung der *mCherry* cDNA über die Schnittstellen *BamHI* und *XhoI* hingegen ermöglichte die spätere Fusion mit den N-Termini der Proteine und führte zum geplanten Vektor pTARGET Δ Sfi-mCherry-BFP. Bevor die *MLL* cDNA Kasette in den Vektor eingebracht werden konnte, war es notwendig, das vorhandene Stop-Codon zu entfernen. Dieser Schritt wurde bereits zuvor für die *AF4/MLL* cDNA Kasette durchgeführt. Mittels PCR wurde ein etwa 1000 bp großes Fragment des *MLL* C-

Terminus amplifiziert, welches mit dem letzten kodierenden Triplet unmittelbar vor dem Stop-Codon endet. Im folgenden Klonierungsschritt wurde das entsprechende Fragment im Vektor pTARGET Δ Sfi-MLL über die Restriktionsschnittstellen *SbfI* (innerhalb der *MLL* cDNA) und *ClaI* (innerhalb des *SfiI*-Linkers) ausgetauscht, was in der Entfernung des Stop-Codons aus der *MLL* cDNA resultierte. Bei dieser Klonierung musste beachtet werden, dass innerhalb der pTARGET Sequenz eine weitere *ClaI* Erkennungsstelle vorhanden ist. Die Entfernung des Stop-Codons wurde durch Sequenzierung des Bereiches bestätigt. Im Folgenden konnten die cDNA Kassetten beider *full length* Proteine über die Restriktionsschnittstellen *SfiI* und *ClaI* in den Vektor pTARGET Δ Sfi-mCherry-BFP eingebracht werden. Alle klonierten Vektoren wurden mittels Restriktionsverdau überprüft (siehe Abbildung 3-27).

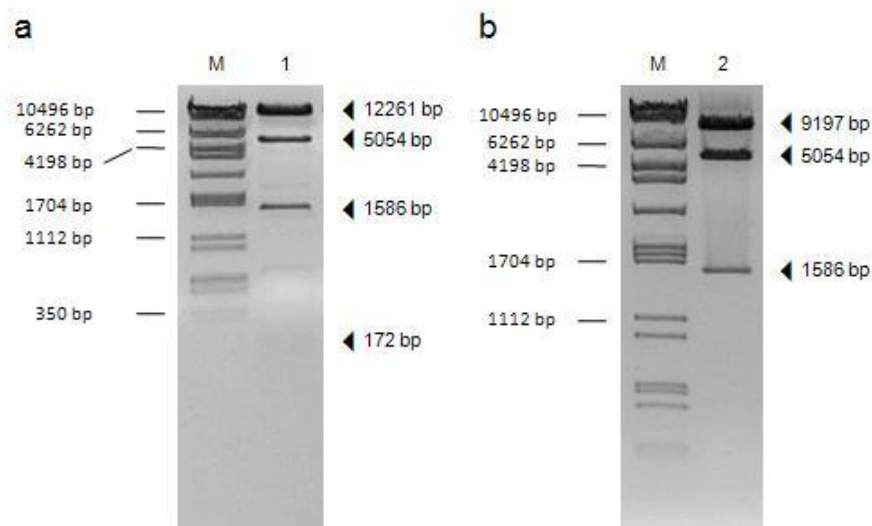


Abbildung 3-27: Restriktionsverdau der klonierten Plasmide für die Fluoreszenz-mikroskopische Interaktionsanalyse. a) pTARGET Δ Sfi-mCherry-MLL-BFP (Spur 1) mit den Restriktionsenzymen *AvrII* und *XhoI*. b) pTARGET Δ Sfi-mCherry-der4-BFP (Spur 2) mit den Restriktionsenzymen *AvrII* und *XhoI*. Größen der Markerbanden (M) sowie die Größen der durch Restriktionsverdau erhaltenen Fragmente (◄) sind angegeben.

Expressionstest der doppelt-farbmarkierten *full length* Proteine

Bevor die Plasmide für den Interaktionstest eingesetzt werden konnten, musste die Expression der Proteine überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden die generierten Vektoren mittels Transfektion in HeLa Zellen eingebracht. Die Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion unter dem Fluoreszenz-Mikroskop analysiert.

Bei diesen Analysen wurde deutlich, dass es äußerst schwierig war, die Fluoreszenzmarkierten Proteine zu detektieren. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die kodierenden Sequenzen der Fluoreszenzproteine nur einen sehr geringen Anteil der Gesamtproteine ausmachen und sie demnach verhältnismäßig gering exprimiert werden (720 bp von insgesamt 13480 bp bei Fusion mit der *MLL* cDNA, bzw. 720 bp von 10220 bp bei Fusion mit der *AF4/MLL* cDNA). Zwar konnten die Fluoreszenzproteine im Generellen detektiert werden, jedoch war die Fluoreszenz so schwach, dass eine sehr hohe Belichtungszeit verwendet werden musste, um diese sichtbar zu machen. Dies wiederum hatte zwei verschiedene Auswirkungen. Zum einen resultiert die hohe Belichtungszeit in einem recht hohen Hintergrundleuchten, wodurch die eigentliche Fluoreszenz undeutlicher wird. Zum anderen führt es zu einem beschleunigten Ausbleichen (Photobleaching) der Fluoreszenzproteine, was letztendlich einen Verlust der Fluoreszenz zur Folge hat. In Abbildung 3-28 sind die transfizierten Zellen exemplarisch gezeigt.

Wie deutlich zu erkennen ist, ist die Fluoreszenz der Markerproteine bei Fusion mit dem *MLL* Protein sehr schwach (Abbildung 3-28 a), die Fusion mit dem *AF4/MLL* Protein zeigt teilweise eine deutlichere, wenn auch weiterhin schwache Fluoreszenz (Abbildung 3-28 b). Trotzdem konnten mit Hilfe dieser Expressionsversuche interessante Beobachtungen gemacht werden. Während sowohl der *MLL*-N-Terminus (*MLL_N*) als auch der *MLL*-C-Terminus (*MLL_C*) stets eine punktuelle Lokalisation am Nukleolus aufweisen (Abbildung 3-28 a), scheinen die beiden Proteinfragmente des *AF4/MLL* Proteins (*der4_N* und *der4_C*) in den meisten Zellen getrennt voneinander lokalisiert zu sein (Abbildung 3-28 b, obere Reihe). Das mCherry Protein ist ohne eine punktuelle Lokalisation verteilt im Cytoplasma der Zellen zu finden, das BFP hingegen scheint innerhalb des Nukleus lokalisiert. Im überlagerten Zwei-Farben Bild ist die getrennte Lokalisation sehr deutlich zu erkennen (Abb. 3-28 b, obere Reihe, rechtes Bild). In deutlich weniger Zellen konnte eine Co-Lokalisation der Markerproteine am Nukleus beobachtet werden (Abbildung 3-28 b, untere Reihe).

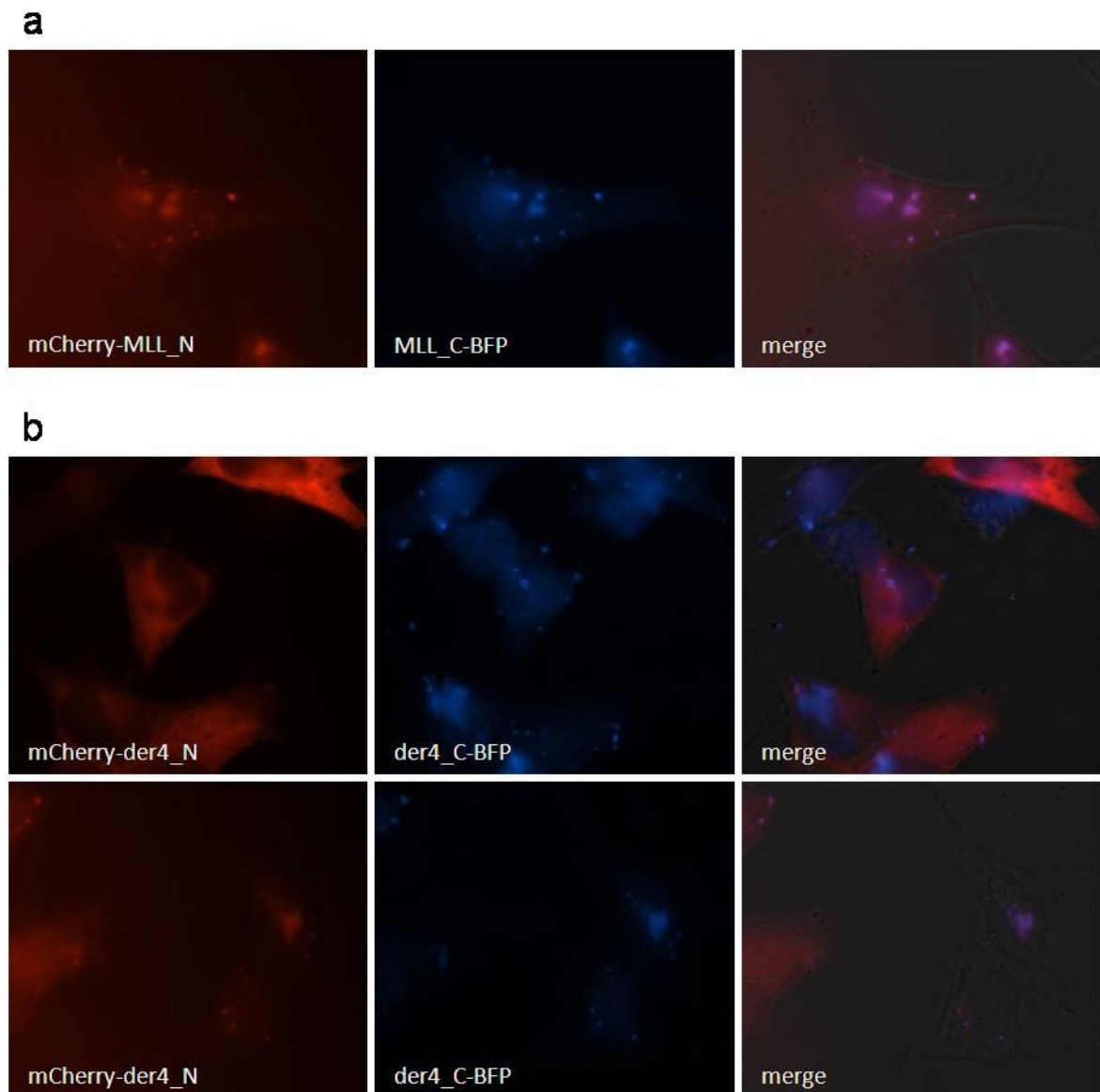


Abbildung 3-28: Mikroskopische Analyse transfizierter HeLa Zellen zur Detektion von mCherry-MLL-BFP und mCherry-der4-BFP. Expression von: a) pTARGET-mCherry-MLL-BFP; b) pTARGET-mCherry-der4-BFP. N-Termini der Proteine fluoreszieren rot, C-Termini der Proteine fluoreszieren blau.

Im Generellen lassen die Expressionsversuche folgende Schlüsse zu: Die geringe Fluoreszenz-Intensität der Markerproteine bietet keine optimale Voraussetzung für die geplanten Interaktionsanalysen. Die Detektion eines zusätzlichen Fluoreszenzproteins (GFP) erhöht die Gesamt-Belichtungszeit und verstärkt somit das Ausbleichen der Fluoreszenzproteine. Im Falle des AF4/MLL Fusionsproteins besteht die zusätzliche Problematik, dass die beiden Proteinfragmente der4_N und der4_C (= MLL_C) innerhalb der Zellen häufig getrennt voneinander detektiert werden. Nach unserem Modell (vgl.

Abschnitt 2.5.5.) kommt es in der natürlichen Situation jedoch für das MLL Protein als auch für das AF4/MLL Protein gleichermaßen zu einer intramolekularen Proteininteraktion. Bei einer getrennten Lokalisation ist keine Beurteilung bezüglich einer potentiellen Inhibierung der Interaktion durch das FYRC_B3 Fragment möglich. Trotz der beobachteten geringen Fluoreszenz der beiden Markerproteine, sowie ihrer recht schwierigen Detektion, wurden im Folgenden Interaktionsanalysen mit diesen Vektoren durchgeführt.

Co-Transfektion der doppelt-farbmarkierten Konstrukte mit dem Vektor p3-GFP-FYRC_B3 für die Interaktionsanalyse

Die Interaktionsanalysen der doppelt-farbmarkierten *full length* Proteine mit dem FYRC_B3 Fragment wurden in HeLa Zellen durchgeführt. Zur Co-Expression wurden die entsprechenden Vektoren durch Co-Transfektion in HeLa Zellen eingebracht. 24h nach Transfektion wurden die Zellen mittels Fluoreszenz-Mikroskopie analysiert. Abbildung 3-29 zeigt exemplarisch die Resultate der Interaktionsanalysen auf.

Dargestellt sind jeweils die einzelnen Fluoreszenzproteine (obere Reihe), das überlagerte 3-Farbenbild aller Fluoreszenzproteine (mittlere Reihe, großes Bild) sowie das überlagerte Bild von je zwei Fluoreszenzproteinen (untere Reihe). Die Co-Expression des FYRC_B3 Fragments mit dem *full length* MLL Protein (Abb. 3-29 a) schien auf dessen Lokalisation, bzw. auf die Lokalisation sowie Interaktion der beiden MLL Proteinfragmente MLL_N und MLL_C keinen Einfluss zu haben. Wie in der Abbildung deutlich zu erkennen ist, bestand weiterhin eine Co-Lokalisation des mCherry Proteins mit dem BFP innerhalb des Zellkerns, während das GFP Fusionsprotein im Cytoplasma detektiert werden konnte (Abb. 3-29 a, mittlere Reihe). Die Interaktion des FYRC_B3 Fragments mit dem MLL Protein, welche durch die vorangegangenen Co-Immunopräzipitationen eindeutig nachgewiesen wurde, kann in diesem System nicht bestätigt werden. Da die Interaktion vermutlich gravierende Auswirkungen auf die Zellen hat, ist es durchaus möglich, dass die entsprechenden Zellen absterben und daher nicht mehr detektiert werden können.

Bei Betrachtung der Co-Expression des FYRC_B3 Fragments mit dem *full length* AF4/MLL Protein stellte sich die Auswertung schwieriger dar. Wie bereits bei den vorangegangenen Expressionstests beobachtet, war das mCherry Protein innerhalb der meisten Zellen diffus über das Cytoplasma verstreut (Abb. 3-29 b, obere Reihe Mitte, weißer Pfeil). In diesen Zellen bestand keine direkte Co-Lokalisation mit dem BFP Markerprotein, welches vermehrt im Zellkern detektiert werden konnte (Abb. 3-29 b, obere Reihe rechts).

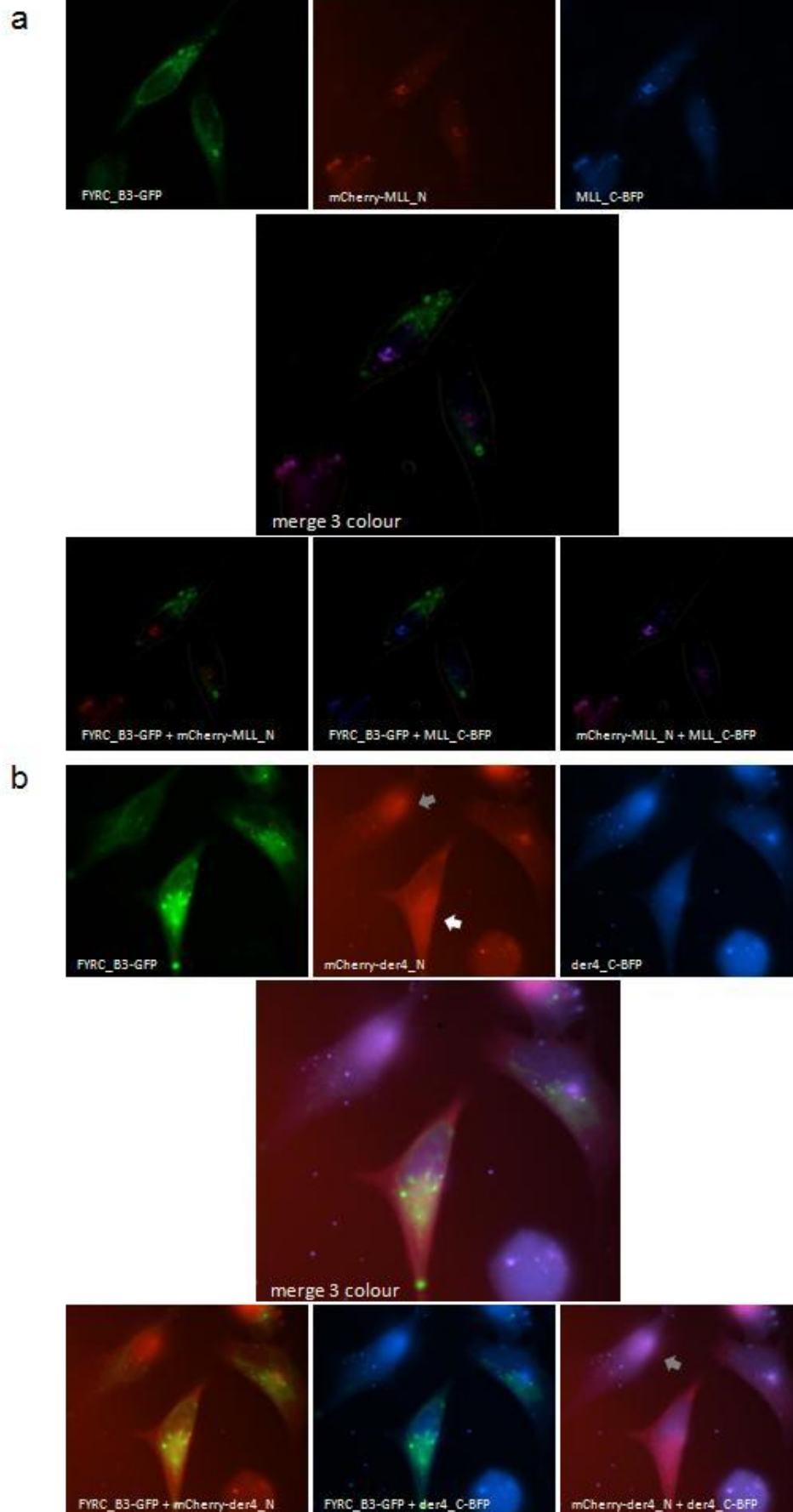


Abbildung 3-29: Mikroskopische Analyse von HeLa Zellen nach Co-Transfektion von FYRC_B3 mit den *full length* Proteinen MLL und der4. a) pTARGET Δ Sfil-mCherry-MLL-BFP und p3-GFP-FYRC_B3; b) pTARGET Δ Sfil-mCherry-der4-BFP und p3-GFP-FYRC_B3.

Betrachtet man in diesen Zellen die Lokalisation des GFP Markerproteins, so könnte eine Interaktion mit dem N-Terminalen der4 Fragment angenommen werden (siehe Abb. 3-29 b, untere Reihe links). Aufgrund einer fehlenden punktuellen Lokalisation ist eine genaue Aussage diesbezüglich jedoch recht schwierig. Nur in einigen wenigen Zellen konnte das mCherry Protein innerhalb des Zellkerns detektiert werden (Abb. 3-29 b, obere Reihe Mitte, grauer Pfeil). In den Zellen, welche eine Co-Lokalisation von mCherry mit BFP innerhalb des Zellkerns zeigten (Abb. 3-29 b, untere Reihe rechts, grauer Pfeil), konnte keine Interaktion des FYRC_B3 Fragments mit dem der4_N Fragment beobachtet werden. Es ist fraglich, weshalb die mittels Co-Immunopräzipitation nachgewiesene Interaktion des FYRC_B3 Fragments mit den *full length* Proteinen über diesen experimentellen Ansatz nicht bestätigt werden konnte. Da jedoch die experimentellen Bedingungen dieser Versuche nicht optimal waren, muss durchaus in Frage gestellt werden, welche Aussagekraft sie besitzen. Die Optimierung der experimentellen Bedingungen könnte dazu beitragen die Ursache für die hier erhaltenen Resultate zu klären.

3.3.2 Auswirkungen verschiedener MLL Fragmente auf die Konstitution von Zellen

Während der Interaktionsstudien in HeLa Zellen wurde deutlich, dass sich einige der untersuchten MLL Fragmente negativ auf den Vitalitätszustand der transfizierten Zellen auswirken. 24 Stunden nach der Transfektion zeigten sehr viele der transfizierten Zellen Veränderungen in ihrer Morphologie. Die betroffenen Zellen rundeten sich stark ab und begannen sich von der Zellkulturschale abzulösen. Dies spricht für ein Absterben der Zellen infolge der Expression einiger MLL Fragmente. Aus diesem Grund sollten die Effekte dieser Fragmente auf Zellen genauer untersucht werden. Um eine Aussage bezüglich der Intensität der Auswirkungen einzelner Fragmente treffen zu können, wurden zu Beginn verschiedene Fragmente und Fragment-Kombinationen vergleichend untersucht. Im Folgenden wurden die erhaltenen Ergebnisse genutzt, um die Untersuchungen auf t(4;11)-positive Zellen auszuweiten.

Bestimmung der Anzahl toter Zellen aufgrund optischer Bewertung

Um den Effekt verschiedener MLL Fragmente hinsichtlich seiner Intensität bewerten zu können, wurden erneut Zellen mit verschiedenen MLL Fragmenten, MLL Fragment-Kombinationen bzw. mit den „Leervektoren“ transfiziert und zu zwei verschiedenen Zeitpunkten ($t = 24\text{h}$ bzw. 48h) analysiert. Die ersten Analysen erfolgten in der Art, dass die Anzahl „gesunder“ Zellen sowie „toter“ Zellen nach Transfektion durch rein optische Bewertung bestimmt wurde. Zellen wurden als „gesund“ bewertet, wenn sie sich in ihrer Morphologie von den nicht-transfizierten Zellen nicht unterschieden. Zeigten die Zellen hingegen ein Abrunden und/oder begannen sich abzulösen, wurden sie als „tot“ eingestuft. Zellen, welche sich bereits komplett von der Zellkulturschale abgelöst hatten, wurden entsprechend in die Kategorie der „toten“ Zellen eingeordnet. Diese ersten Versuche wurden mit den N-terminalen MLL Fragmenten FYRN_A1, FYRN_A2 und FYRN_A3 sowie mit den C-terminalen Fragmenten FYRC_B1, FYRC_B2 und FYRC_B3 durchgeführt. Als Kontrolle dienten die beiden „Leervektoren“ p3-NLS-GFP/GST-NES sowie pc3-RevM10BL-BFP. In Abbildung 3-30 sind exemplarisch Zellen dieser Versuche gezeigt, welche als „tot“ bzw. „gesund“ eingestuft wurden.

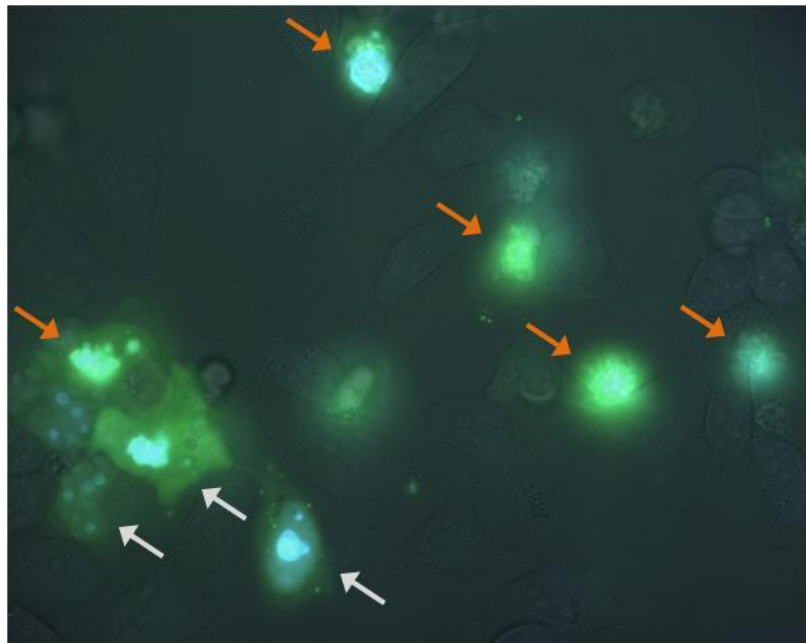


Abbildung 3-30: Mikroskopische Analyse transfizierter Zellen zur Veranschaulichung der Einteilung in tote und lebende Zellen anhand der Morphologie. Rote Pfeile: kranke bzw. tote Zellen; graue Pfeile: lebende Zellen.

Die für diese Versuche durchgeführten Transfektionen bzw. Co-Transfektionen und die jeweils erhaltenen Resultate sind im Säulendiagramm in Abbildung 3-31 wiedergegeben. Pro Transfektion (bzw. Co-Transfektion) wurden nach 24 bzw. 48h je mindestens 150 Zellen aus insgesamt 4 verschiedenen Sichtfeldern ausgezählt. Die Versuche wurden zweimal unabhängig voneinander wiederholt.

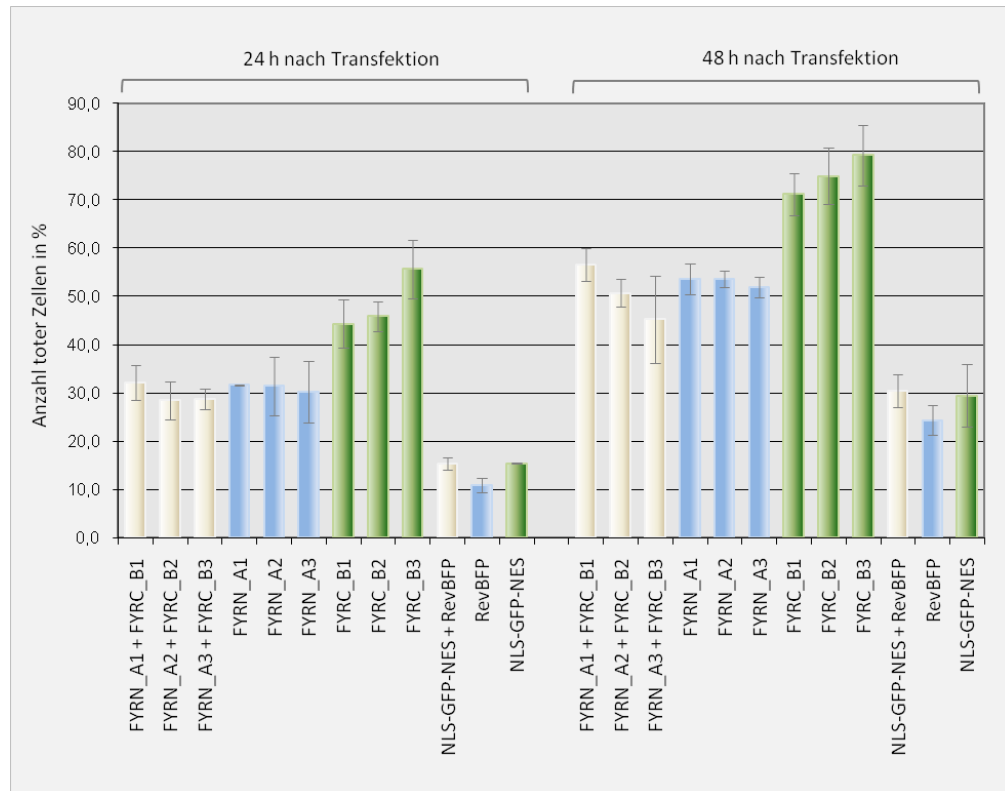


Abbildung 3-31: Anzahl toter HeLa Zellen infolge der Expression verschiedener MLL Fragmente. Die jeweilig exprimierten MLL Fragmente bzw. Fragment-Kombinationen sind unterhalb des Diagramms angegeben. Linke Diagrammhälfte: Auswertung 24h nach Transfektion; rechte Diagrammhälfte: Auswertung 48h nach Transfektion. Weiße Balken: Co-Expression von N- und C-terminalen MLL Fragmenten (als BFP bzw. GFP Fusionsproteine); blaue Balken: Expression der N-terminalen MLL Fragmente (als BFP Fusionsproteine); grüne Balken: Expression der C-terminalen MLL Fragmente (als GFP Fusionsproteine). Standardabweichungen sind als Fehlerbalken angegeben.

Das Säulendiagramm veranschaulicht sehr deutlich, dass die Expression aller getesteten MLL Fragmente, ob alleine oder in den jeweiligen Kombinationen, ein Absterben der Zellen bewirkte. Betrachtet man die Anzahl toter Zellen nach 24h, lag der prozentuale Anteil toter Zellen bei den Kontrollversuchen bei ca. 15%. Bei Co-Expression der Fragmente FYRN_A1 mit FYRC_B1, FYRN_A2 mit FYRC_B2 bzw.

FYRN_A3 mit FYRC_B3 sowie bei alleiniger Expression der N-terminalen MLL Fragmente stieg dieser Wert bereits auf $\approx 30\%$. Interessanterweise waren die Auswirkungen auf die Zellen am stärksten, wenn die C-terminalen Fragmente alleine exprimiert wurden. Im Falle der Proteinfragmente FYRC_B1 und FYRC_B2 waren nach 24h etwa 45% der Zellen abgestorben, bei Expression des FYRC_B3 Fragments sogar 55% der Zellen. Bei Analyse der Zellen 48h nach Transfektion ergab sich tendenziell betrachtet ein sehr ähnliches Bild. Die wenigsten toten Zellen wurden mit einem Anteil von 30% bei den Kontrollversuchen gezählt. Entsprechend dem Verhältnis zum Zeitpunkt $t = 24h$, lag der Anteil toter Zellen bei Co-Expression der MLL Fragmente bzw. Expression der N-terminalen MLL Fragmente nach 48h mit 45-55% ebenfalls höher als bei den Kontrollzellen. Die stärkste Auswirkung hatte jedoch erneut die Expression der C-terminalen MLL Fragmente. Alle 3 Fragmente bewirkten bei mindestens 70% der Zellen ein Absterben, die Expression des FYRC_B3 Fragments resultierte in einem Anteil von 80% toter Zellen. Die Beobachtung, dass die C-terminalen Fragmente bei alleiniger Transfektion einen stärkeren Effekt auf die Vitalität der Zellen haben als bei Co-Expression mit den N-terminalen Fragmenten, kann damit begründet werden, dass durch die Interaktion mit den N-terminalen Gegenparts weniger freies Protein in der Zelle vorhanden ist. Dementsprechend kann das Protein weniger Interaktionen bzw. Wechselwirkungen mit anderen Proteinen eingehen, welche sich potentiell letal auswirken. Der Nachweis der Interaktion des letalsten Fragments FYRC_B3 mit endogenem *full length* MLL Protein (siehe Abschnitt Co-Immunopräzipitation) legt die Vermutung nahe, dass die beobachteten Auswirkungen durch diese spezifische Interaktion vermittelt werden.

3.3.3 Letalitätstest von FYRC_B3 in verschiedenen Vektor-Systemen

Aufgrund der beobachteten starken Effekte des FYRC_B3 Fragments wurde es in weiteren Versuchen genauer untersucht. Um eine Aussage darüber treffen zu können, inwieweit die zelluläre Lokalisation des Proteins den beobachteten Effekt beeinflusst, sollte das FYRC_B3 Fragment in Vektoren kloniert werden, welche über andere bzw. keine Lokalisationssequenzen verfügen. Zum einen wurde der zweite Vektor des zellbasierten PTB-Systems verwendet, welcher bekanntermaßen eine nukleoläre Verankerung bedingt. Zum anderen kam der eukaryontische Expressionsvektor pTARGET zum Einsatz. Da dieser Vektor über keinerlei Lokalisationssequenzen verfügt, sollte eine freie Diffusion des gebildeten Proteinfragments innerhalb der Zelle möglich sein. Um das Protein in der Zelle detektieren zu können, wurde es C-terminal mit dem BFP Markerprotein fusioniert. Zur Klonierung beider cDNA Bereiche in den pTARGET

Vektoren wurden unter Verwendung geeigneter Oligonukleotide mittels PCR amplifiziert und nacheinander in den Vektor eingebracht (FYRC_B3, anschließend BFP). Die Klonierung des FYRC_B3 Fragments in den Vektor pc3-RevM10BL-BFP erfolgte ebenfalls nach Amplifikation des Fragments mit entsprechenden Oligonukleotiden. Beide Klonierungen wurden mittels Restriktionsverdau (siehe Abbildung 3-32) und Sequenzierung der Amplifikate überprüft.

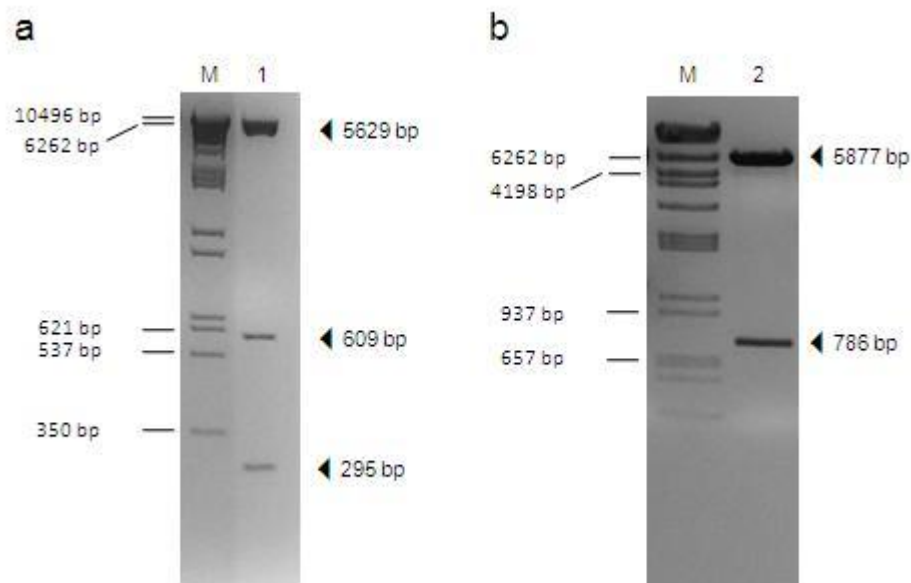


Abbildung 3-32: Restriktionsverdau der klonierten Plasmide für Aktivitätsanalysen des FYRC_B3 Fragments. a) pTARGET-FYRC_B3-BFP (Spur 1) mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *XhoI*. b) pc3-FYRC_B3-BFP (Spur 2) mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *EcoRV*. Größen der Markerbanden (M) sowie die Größen der durch Restriktionsverdau erhaltenen Fragmente (◄) sind angegeben

Analog zu den ursprünglichen Versuchen wurden die neu klonierten Plasmide zur Transfektion von HeLa Zellen verwendet. 24h und 48h nach der Transfektion wurden die Zellen unter dem Mikroskop begutachtet und es wurden die toten und lebenden Zellen anhand ihrer Morphologie ausgezählt. Die Versuche wurden zweimal unabhängig voneinander durchgeführt. Pro Versuch wurden mindestens 100 Zellen aus insgesamt 4 Sichtfeldern ausgezählt. Das Säulendiagramm in Abbildung 3-33 stellt die erhaltenen Resultate dar.

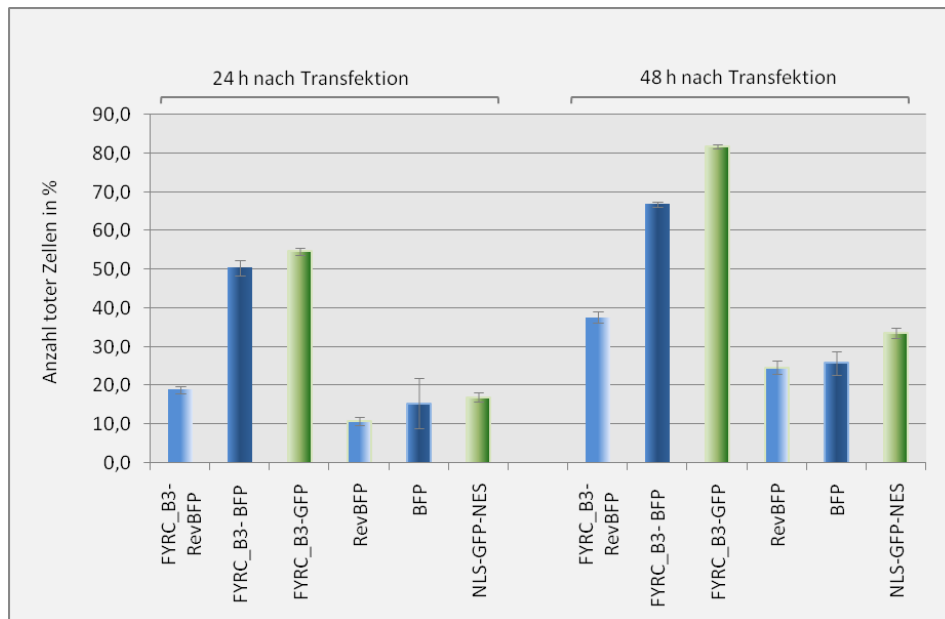


Abbildung 3-33: Anzahl toter HeLa Zellen infolge der Expression des FYRC_B3 Fragments in verschiedenen Vektoren. ■: FYRC_B3 als BFP Fusionsprotein mit NLS; ■: FYRC_B3 als BFP Fusionsprotein ohne Lokalisationssequenz; ■: FYRC_B3 als GFP Fusionsprotein mit NLS und NES. Standardabweichungen sind als Fehlerbalken angegeben.

Anhand dieser Darstellung wird deutlich, dass die negativen Auswirkungen des FYRC_B3 Fragments auf den Vitalitätszustand von Zellen am stärksten ausgeprägt sind, sobald es durch vorhandene Lokalisationssignale aktiv zwischen Zellkern und Cytoplasma pendelt (grüne Balken, Expression im p3-NLS-GFP/GST-NES Vektor). Fehlen die Lokalisationssignale (dunkelblaue Balken, Expression im pTARGET Vektor), sind die Effekte weiterhin deutlich zu beobachten, jedoch im direkten Vergleich etwas abgeschwächt. Wird das FYRC_B3 Fragment durch Fusion mit einem starken nukleären Lokalisationssignal innerhalb des Zellkerns festgehalten, so verliert es seine letalen Effekte nahezu vollständig (hellblaue Balken, Expression im pc3-RevM10BL-BFP Vektor). Es ist anzunehmen, dass das vom pTARGET Vektor gebildete Protein durch seine geringe Größe auch ohne Lokalisationssignale in der Lage ist, innerhalb der Zellen zu diffundieren. Der fehlende Effekt des Fragments bei Expression im pc3-RevM10BL-BFP Vektor legt die Vermutung nahe, dass er zu einem großen Teil durch Interaktionen mit anderen Proteinen im Cytoplasma der Zellen hervorgerufen wird. Für die weiteren Versuche wurde der p3-NLS-GFP/GST-NES Vektor als Expressionskonstrukt eingesetzt, da die Auswirkungen des FYRC_B3 Fragments in diesem Fall am stärksten ausgeprägt waren.

3.3.4 Effekt der FYRC-Fragmente: Durchflusscytometrische Analyse von HeLa und SEM Zellen

Die ersten Auswertungen bezüglich der Letalität der verschiedenen Fragmente zeigten deutlich, dass die C-terminalen MLL Fragmente im Vergleich mit den N-terminalen Fragmenten stärkere Auswirkungen auf HeLa Zellen haben. Hierbei erwies sich speziell das FYRC_B3 Fragment als äußerst effektiv. Da die Vermutung bestand, dass die letalen Effekte auf die Zellen durch Interaktion der gebildeten Fragmente mit dem *full length* Protein zustande kommt, war zu untersuchen, ob die gleichen Fragmente in Zellen mit den Derivat-Proteinen AF4/MLL und MLL/AF4 ähnliche Auswirkungen haben würden. Im Folgenden sollte daher die Auswirkung der Expression auf den Zustand von t(4;11)-positiven SEM Zellen untersucht werden. Es war durchaus möglich, dass die MLL Fragmente in diesem zellulären Kontexte unterschiedlich ausgeprägte Effekte hervorrufen, weshalb die nächsten Versuche mit allen generierten C-terminalen MLL Fragmenten sowohl an HeLa Zellen als auch an SEM Zellen durchgeführt wurden.

Aufgrund der hohen Resistenz der SEM Zellen gegenüber Transfektionen und der daraus resultierenden extrem niedrigen Transfektionsrate war es nicht möglich, diese Versuche am Mikroskop auszuwerten. Zusätzlich wäre eine Unterscheidung gesunder und kranker Zellen aufgrund der natürlichen Form der Zellen schwierig gewesen. SEM Zellen sind recht kleine Suspensionszellen mit einer kugeligen Form, so dass Veränderungen in der Morphologie viel schwieriger zu erkennen sind, als es bei HeLa Zellen der Fall ist. Aus diesem Grund wurden die Auswertungen der folgenden Versuche per Durchflusscytometrie durchgeführt. Hierbei wurden die transfizierten Zellen anhand der GFP Fluoreszenz identifiziert und gezählt, die toten Zellen wurden durch eine vorausgegangene Propidiumiodid-Färbung für das Durchflusscytometer sichtbar gemacht.

Letalitätstest aller C-terminalen Fragmente an HeLa Zellen

Die Transfektion der HeLa Zellen wurde wie gewohnt unter Verwendung von PEI durchgeführt. Zu zwei Zeitpunkten, $t = 24\text{h}$ bzw. $t = 48\text{h}$ post Transfektion, wurden die Zellen im Durchflusscytometer gemessen. Es wurden mindestens 5000 Zellen, z.T. auch 10000 Zellen pro Experiment ausgewertet. Die Versuche wurden dreimal unabhängig voneinander wiederholt. Zur ersten Analyse der gemessenen Proben wurde die Anzahl toter Zellen in den transfizierten Zellpopulationen bestimmt. In Abbildung 3-34 sind die Ergebnisse dieser Auswertungen in Form eines Säulendiagramms wiedergegeben.

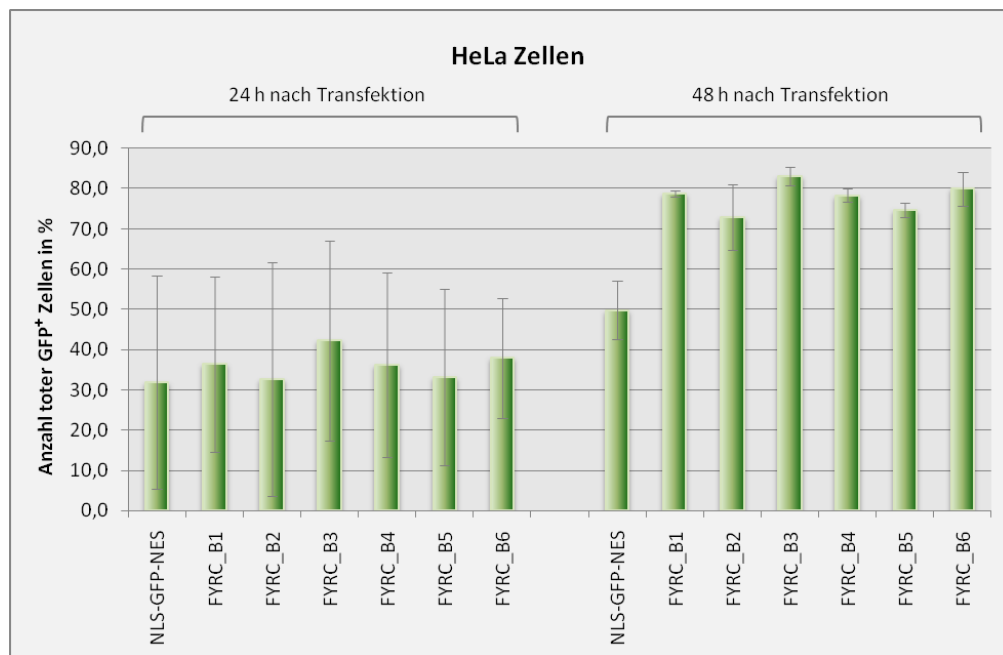


Abbildung 3-34: Anzahl toter HeLa Zellen in den GFP⁺ Zellpopulationen infolge der Expression der C-terminalen MLL Fragmente. Das jeweilig exprimierte Fragment ist angegeben. Linke Diagrammhälfte: Auswertung zum Zeitpunkt t = 24h; rechte Diagrammhälfte: Auswertung zum Zeitpunkt t = 48h. Standardabweichungen sind als Fehlerbalken angegeben.

Bei Betrachtung dieses Säulendiagramms ist klar erkennbar, dass die erhaltenen Werte zu den Zeitpunkten t = 24h und t = 48h in der Tendenz übereinstimmten (FYRC_B3 hatte stets die stärksten Effekte, während beispielsweise bei Expression des Kontrollplasmids immer die schwächsten Effekte detektiert wurden), jedoch erst zum Zeitpunkt t = 48h deutliche Unterschiede zwischen den Kontrollzellen (NLS-GFP-NES) und den Zellen mit MLL Fragmenten (FYRC_B1 – FYRC_B6) zu erkennen waren. Hinzu kam, dass die Standardabweichung zum Zeitpunkt t = 24h extrem hoch waren. Bei genauerer Analyse der Ergebnisse des Durchflusscytometers wurde deutlich, dass die Anzahl aller toter Zellen bei der ersten Versuchsdurchführung in den Proben t = 24h generell sehr gering war, während sie bei der dritten Durchführung durchschnittlich sehr hoch war. Dies bezog sich nicht nur auf die transfizierten Zellen (GFP⁺) in den gemessenen Proben, sondern gleichermaßen auf die untransfizierten Zellen (GFP⁻). Das Liniendiagramm in Abbildung 3-35 zeigt das jeweilige Verhältnis toter GFP⁺ Zellen in einer Probe zur Gesamtzahl aller toten in der gleichen Probe.

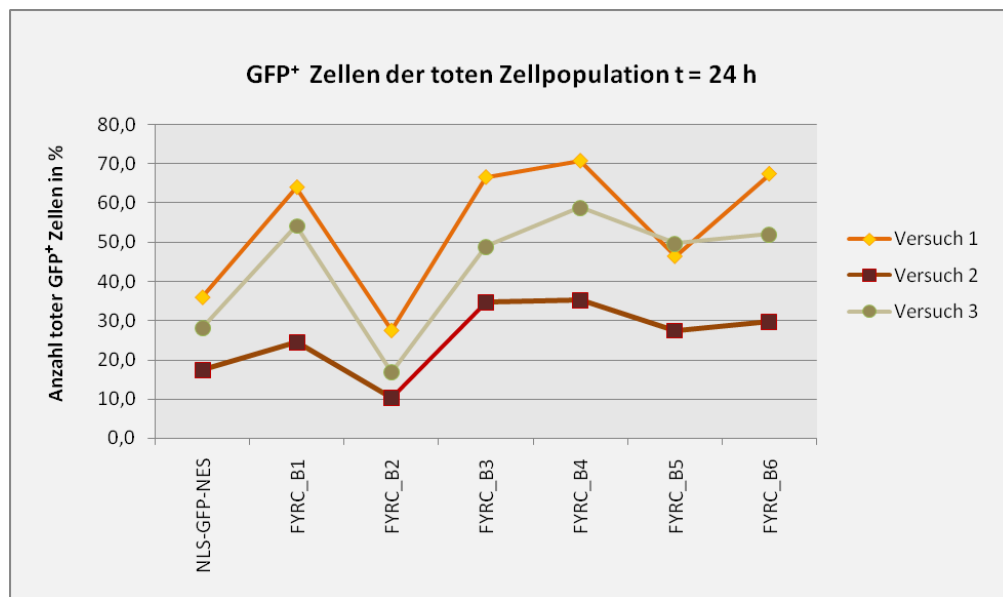


Abbildung 3-35: Vergleichende Darstellung der Anzahl toter GFP⁺ HeLa Zellen im Verhältnis zu der Anzahl aller toten Zellen in einer Probe zum Zeitpunkt t = 24h. Für jeden durchgeführten Versuch sind die gemessenen Werte aller Proben gezeigt. Das in der jeweiligen Probe exprimierte Fragment ist angegeben.

Das Liniendiagramm zeigt, dass auch hier die Werte aller drei Versuche einen entsprechend großen Abstand aufwiesen, die Tendenz der einzelnen Proben untereinander jedoch in allen drei Versuchen gleich war. Beispielsweise war bei Expression der Fragmente FYRC_B3, FYRC_B4 und FYRC_B6 das Verhältnis des prozentualen Anteils toter GFP⁺ Zellen zum prozentualen Anteil aller toten Zellen in der Probe stets höher als es bei Expression des FYRC_B2 Fragments oder in der Kontrollgruppe der Fall war. Dies bedeutet, dass die großen Unterschiede in der Zahl toter GFP⁺ Zellen bei den drei Versuchen, und damit die hohen Standardabweichungen, in den großen Unterschieden der Gesamtzahl toter Zellen begründet liegt. Demzufolge sind die im Säulendiagramm in Abbildung 3-34 dargestellten Ergebnisse trotz der starken Standardabweichungen aussagekräftig. Wie bereits erwähnt, waren jedoch deutliche Effekte der MLL Fragmente erst zum Zeitpunkt t = 48h zu beobachten. Das FYRC_B3 Fragment stellte sich auch bei diesen Experimenten als das Fragment mit den stärksten Effekten heraus. Bis zu 85% der transfizierten Zellen waren 48h nach Transfektion des Fragments abgestorben. Neben diesem zeigte auch das FYRC_B6 Fragment mit einem Prozentsatz von etwa 80% toter GFP⁺ Zellen nach 48h sehr starke Effekte. Mehr als 70% tote Zellen wurden bei Expression des schwächsten Effektors FYRC_B2 detektiert. Die Kontrollzell-Population, welche nur den Vektoranteil NLS-GFP-NES der Fusionsproteine exprimieren, zeigten einen Anteil von <50% toter Zellen.

Dieser Wert liegt zwar deutlich unter dem Ergebnis einiger MLL Fragmente, ist aber dennoch recht hoch. Um die Ursache für diesen hohen Wert zu klären, musste die Anzahl aller toten Zellen in den gemessenen Proben analysiert werden. Dem Diagramm in Abbildung 3-36 ist das durchschnittliche Verhältnis der toten, nicht transfizierten Zellen zu den toten transfizierten Zellen aller Proben zum Zeitpunkt $t = 48\text{h}$ zu entnehmen.

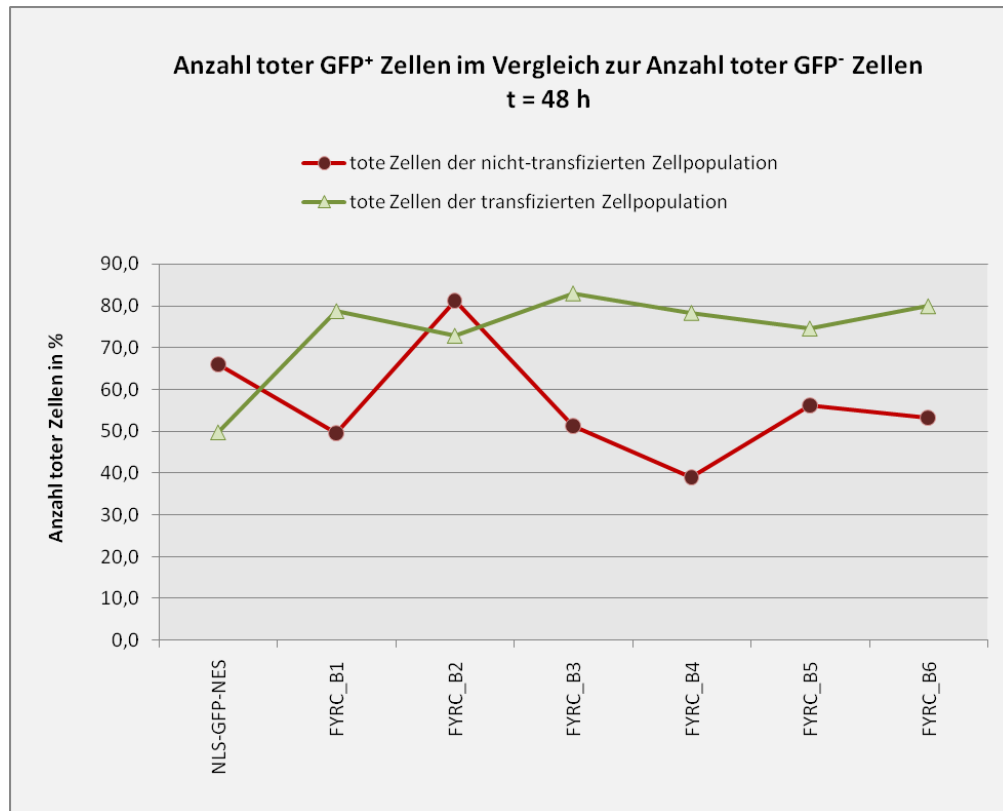


Abbildung 3-36: Anzahl toter HeLa Zellen der GFP⁺ Populationen im Vergleich zu den GFP⁻ Populationen nach Transfektion der C-terminalen MLL Fragmente zum Zeitpunkt $t = 48\text{h}$. Die gezeigten Werte repräsentieren die Mittelwerte der 3 durchgeführten Versuche.

Dieses Diagramm verdeutlicht, dass sowohl bei den Kontrollproben (Expression von NLS-GFP-NES), als auch bei den Proben der FYRC_B2-exprimierenden Zellen, zum Zeitpunkt $t = 48\text{h}$ der Anteil toter Zellen der nicht transfizierten GFP⁻ Zellen noch höher ist, als der Anteil toter Zellen in der GFP⁺ Zellpopulation. Die Zellen beider Proben scheinen demnach aus unbekannter Ursache verstärkt abzusterben. Das bedeutet, dass die Aussagekraft des hohen Prozentsatzes toter GFP⁺ Zellen für diese beiden Proben relativiert wird (ca. 50% bei der Kontrollzellpopulation, bzw. 70% bei Expression von FYRC_B2; siehe Diagramm in Abbildung 3-34). Dies wiederum verleiht den Ergebnissen, welche mit dem FYRC_B3 Fragment erhalten wurden, umso mehr

Nachdruck. Unter Einbezug der Daten des Diagramms in Abbildung 3-36, welches für das FYRC_B3 Fragment einen deutlich geringeren Anteil an toten untransfizierten Zellen zeigt, ist diesem Fragment eindeutig ein starker letaler Effekt auf HeLa Zellen zuzuschreiben. Gleiches gilt für die Fragmente FYRC_B4 und FYRC_B6. Auch hier ist der Anteil toter Zellen der GFP⁺ Zellpopulation mit ca. 80% sehr hoch, während GFP⁻ Zellen der gleichen Probe deutlich weniger tote Zellen aufweisen.

Die 3 C-terminalen MLL Fragmente FYRC_B3, FYRC_B4 sowie FYRC_B6 bewirken bei Expression ein deutliches Absterben von HeLa Zellen.

Letalitätstest aller C-terminalen Fragmente an SEM Zellen

Zur Transfektion der SEM Zellen wurde die Methode der Nucleofektion (Elektroporation unter Verwendung des Nucleofector Kit R von Amaxa) ausgewählt. Elektroporationen ohne dieses Kit erzielten keine messbare Transfektionsrate. Die Einschleusung fremder DNA über virale Transduktion erwies sich zwar als generell möglich, jedoch konnten keine höheren Transfektionsraten erreicht werden, als mit dem Nucleofector Kit (Daten nicht gezeigt). Die ungünstigeren experimentellen Bedingungen im Falle der viralen Transduktion (S2 Arbeiten in unserer Einrichtung nicht möglich) führten zur Auswahl der Nucleofektion als Transfektionsmethode. Die Messung der Proben im Durchflusscytometer erfolgte wie auch bei den HeLa Zellen zu zwei Zeitpunkten, $t = 24\text{h}$ und $t = 48\text{h}$ post Transfektion. Eine Messung umfasste mindestens 5000, teilweise jedoch bis zu 50000 Zellen. Der Versuch wurde dreimal unabhängig voneinander wiederholt. Zur ersten Analyse der erhaltenen Daten wurde die Anzahl toter Zellen in den transfizierten Zellpopulationen bestimmt. In Abbildung 3-37 sind die Ergebnisse dieser Auswertungen in Form eines Säulendiagramms wiedergegeben.

Das Diagramm veranschaulicht, dass bereits zum Zeitpunkt $t = 24\text{h}$ offensichtliche Unterschiede bezüglich der Vitalität zwischen den Kontrollzellen (NLS-GFP-NES Expression) und Zellen, welche MLL Fragmente exprimieren, bestanden. Während die Anzahl toter Zellen bei Expression von NLS-GFP-NES bei etwa 10% lag, waren bei Expression des Fragments FYRC_B1 bereits mehr als 50% der Zellen abgestorben. Es muss darauf hingewiesen werden, dass die Berechnung des Werts der Kontrollzellen lediglich auf den Ergebnissen zweier Versuche (Durchführung 1 und 3) beruht, da bei der zweiten Versuchsdurchführung aufgrund einer extrem schlechten Transfektionsrate keine repräsentative Anzahl GFP⁺ Zellen gemessen wurde.

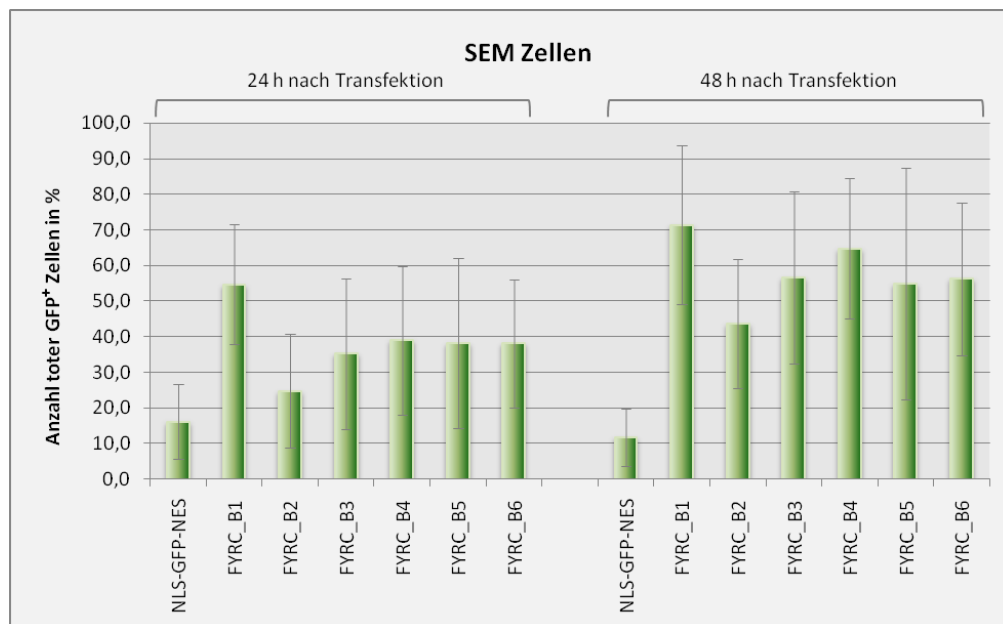


Abbildung 3-37: Anzahl totter SEM Zellen in den GFP⁺ Zellpopulationen infolge der Expression der C-terminalen MLL Fragmente. Linke Diagrammhälfte: Auswertung zum Zeitpunkt t = 24h; rechte Diagrammhälfte: Auswertung zum Zeitpunkt t = 48h. Standardabweichungen sind als Fehlerbalken angegeben.

Daten wurden generell erst in die Auswertung miteinbezogen, wenn mindestens 75 GFP⁺ Zellen detektiert wurden. Die MLL Fragmente FYRC_B3 – FYRC_B6 schienen ebenfalls ein Absterben der Zellen zu bedingen, wenngleich zu einem geringeren Grad als FYRC_B1. Der Anteil totter GFP⁺ Zellen lag in diesen Zellen 24h nach der Transfektion zwischen 30 und 40%. Die Resultate des FYRC_B2 Fragments wurden zwar in diese Grafik integriert, jedoch konnte hier mehrfach nur eine extrem geringe Anzahl GFP⁺ Zellen detektiert werden, so dass die Ergebnisse nicht aussagekräftig sind. Obgleich bei jeder Messung im Durchflusscytometer mindestens 5000 Ereignisse gemessen wurden, wurde bei der zweiten und dritten Versuchsdurchführung zu keinem Messzeitpunkt eine repräsentative Anzahl GFP⁺ Zellen detektiert. Die Messungen zum Zeitpunkt t = 48h zeigten für alle getesteten Fragmente eine ähnliche Tendenz. Der Anteil totter Zellen infolge der Expression des FYRC_B1 Fragments war auf etwa 70% angestiegen. Für die Fragmente FYRC_B3-FYRC_B6 wurde ein Anteil von 55 – 65% totter GFP⁺ Zellen festgestellt. Die Kontrollzellpopulation zeigte mit etwa 10% sogar einen geringeren Anteil totter GFP⁺ Zellen als zum Zeitpunkt t = 24h. Auch hier muss erwähnt werden, dass die Berechnung aufgrund mangelnder Transfektionseffizienz bei Versuch 2 auf nur zwei Werten beruht. Aus dem Säulendiagramm ist zusätzlich abzulesen, dass alle Resultate recht hohe Standardabweichungen aufweisen. Um zu prüfen, inwieweit

diese Standardabweichungen vernachlässigt werden können, wurden die erhaltenen Ergebnisse zum Zeitpunkt $t = 48\text{h}$ der 3 Versuche vergleichend in Form eines Liniendiagramms dargestellt (Abbildung 3-38). Es wurden auch die Werte in die Darstellung integriert, welche nicht als Grundlage für die in Abbildung 3-37 gezeigten Daten verwendet wurden (% toter GFP⁺ Zellen bei Versuch 2 bei der Kontrollzellpopulation).

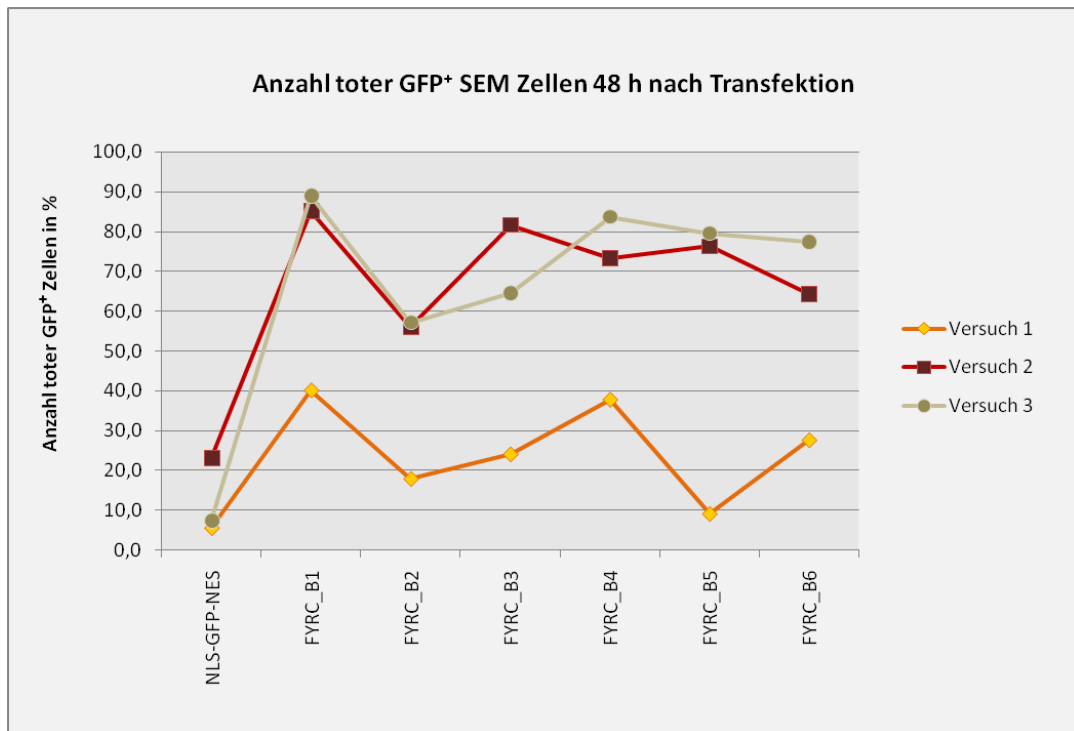


Abbildung 3-38: Vergleichende Darstellung der Anzahl toter GFP⁺ SEM Zellen infolge der Expression der C-terminalen MLL Fragmente zum Zeitpunkt $t = 48\text{h}$ in 3 durchgeführten Versuchen. Für jeden durchgeführten Versuch sind die gemessenen Werte aller Proben gezeigt.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Messwerte des ersten Versuchs für die großen Standardabweichungen verantwortlich sind. Dieses Diagramm veranschaulicht jedoch gleichermaßen, dass die Tendenzen der Anzahl toter GFP⁺ Zellen über alle drei Versuche übereinstimmten. Bei allen Versuchen erwies sich das Fragment FYRC_B1 als der größte Effektor. Dessen Expression bewirkte auch im ersten Versuch, welcher durchschnittlich viel niedrigere Werte aufweist, einen Anteil von 40% toten Zellen. Dies stellt einen deutlichen Unterschied zur Kontrollzellpopulation dar, bei der nur etwa 5% der GFP⁺ Zellen abgestorben waren. Der Unterschied wurde bei Betrachtung der Werte von Versuch 2 und 3 noch deutlicher. Hier standen >80% tote GFP⁺ Zellen bei Expression von FYRC_B1 maximal 25% toten GFP⁺ Zellen in der Kontrollzellpopulation

gegenüber. Dem FYRC_B3 Fragment, welches in HeLa Zellen die stärksten Auswirkungen zeigte, können in SEM Zellen eher durchschnittliche Effekte zugeschrieben werden. Interessanterweise erweist sich das FYRC_B4 Fragment in beiden zellulären Umgebungen als sehr starker letaler Effektor.

Die Ergebnisse der Analysen der transfizierten SEM Zellen im Durchflusscytometer zeigen, dass die verschiedenen MLL Fragmente auch in diesem zellulären Kontext einen letalen Effekt aufweisen. Die nachgewiesene Interaktion des FYRC_B3 Fragments sowohl mit dem *full length* MLL Protein als auch mit dem *full length* AF4/MLL Protein, legt die Vermutung nahe, dass die beobachteten Effekte durch intrazelluläre Interaktion mit einem, möglicherweise auch mit beiden Proteinen entstehen. Möglicherweise ist eine Interaktion des FYRC_B1 Fragments mit dem AF4/MLL Protein begünstigt, während das FYRC_B3 Fragment bevorzugt mit dem MLL Protein in Interaktion tritt. Dies könnte die unterschiedlich ausgeprägten Effekte der Fragmente in den beiden Zelllinien erklären.

3.4 Modell zur Entstehung letaler Effekte durch Expression kurzer MLL Fragmente

Die folgende Abbildung veranschaulicht, auf welche Weise es in Anwesenheit eines C-terminalen MLL Fragments (FYRC_B1, FYRC_B3 oder FYRC_B4) möglicherweise zum Absterben der Zellen kommt.

Die *full length* Proteine MLL bzw. AF4/MLL (der4) werden, unter Erzeugung zweier Proteinfragmente MLL_N bzw. der4_N und MLL_C, von der Protease Taspase 1 an den spezifischen Schnittstellen CS1 und CS2 prozessiert. Bei Anwesenheit eines der C-terminalen Fragmente, FYRC_B1 (speziell für der4), FYRC_B3 (speziell für MLL) oder FYRC_B4, kommt es zur dessen Interaktion mit MLL_N bzw. der4_N, so dass die zwei großen Proteinfragmente keine Interaktion mehr eingehen können. Als Folge können sich keine Multiprotein-Superkomplexe ausbilden, welche für die Funktionen der Proteine unerlässlich sind. Ein Fehlen dieser Komplexe könnte möglicherweise die Ursache für das Absterben der Zellen sein. Um diese Hypothese zu verifizieren, sind noch einige weitere Versuche mit den in dieser Arbeit bestimmten minimalen N- und C-terminalen Interaktionsdomänen nötig.

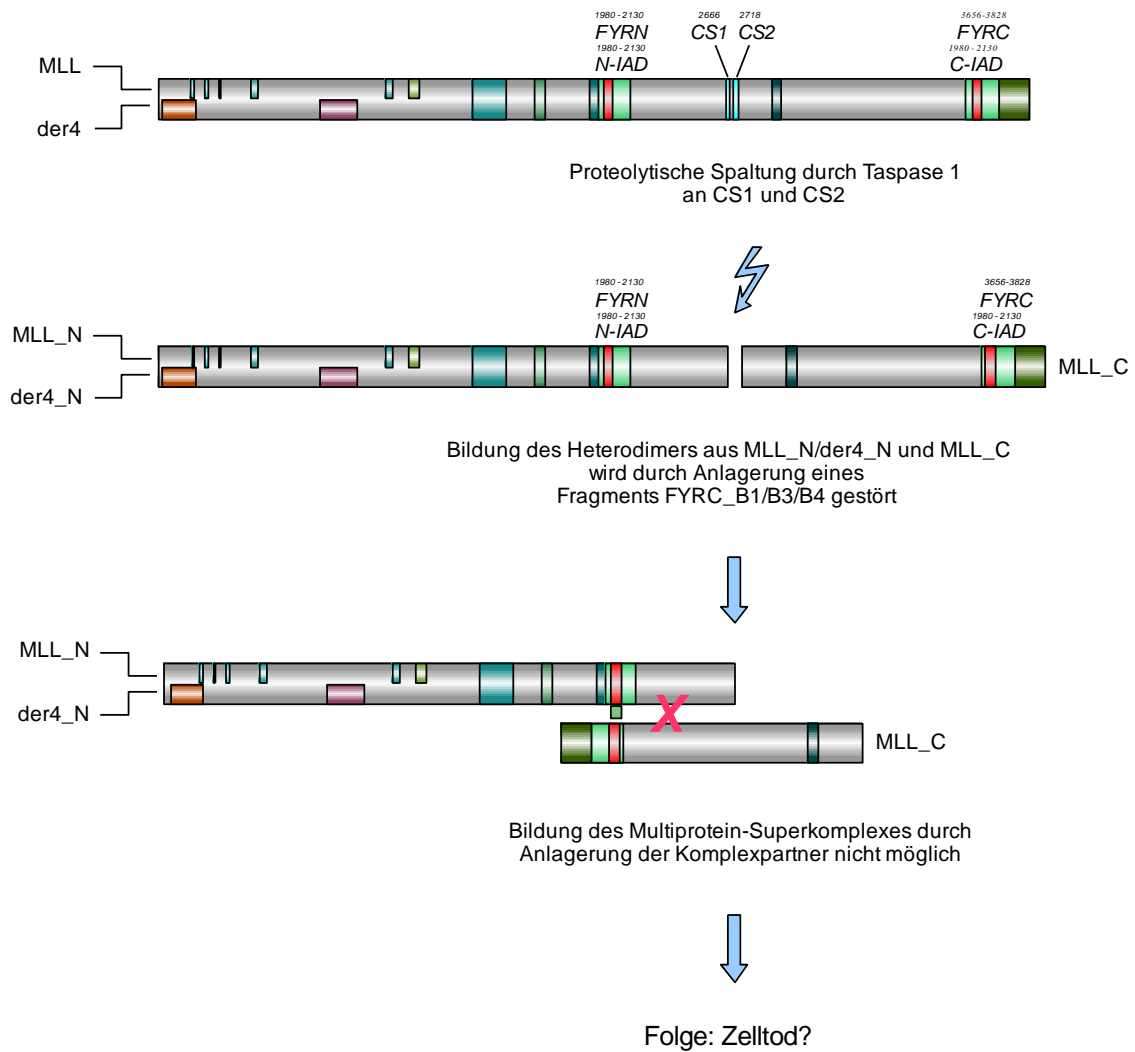


Abbildung 3-39: Möglicher Mechanismus der Entfaltung letaler Effekte bei Expression von verschiedenen C-terminalen MLL Fragmenten in HeLa Zellen sowie in t(4;11)-positiven SEM Zellen. MLL und der4 Protein sind vereinfacht als Kombination dargestellt. Nach Prozessierung des *full length* Proteins durch Taspase 1 können die Proteinfragmente MLL_N bzw. der4_ und MLL_C in Anwesenheit der C-terminalen MLL Fragmente FYRC_B1, FYRC_B3 oder FYRC_B4 keinen Komplex mehr ausbilden. C-IAD und N-IAD: C-terminale bzw. N-terminale Interaktionsdomäne.

4 DISKUSSION

Das *MLL* Gen ist in eine Vielzahl chromosomaler Translokationen involviert, welche in den meisten Fällen die Ausbildung einer Leukämie zur Folge haben. Obgleich bis heute 87 verschiedene Translokationspartner beschrieben wurden, weisen 35% der Translokationen das *AF4* Gen als Translokationspartner auf (Daser and Rabbitts, 2005; Meyer *et al.*, 2006b). Die Translokation t(4;11) resultiert in der Entstehung von zwei Derivat-Chromosomen. In der Folge kommt es zur Expression der Fusionsproteine AF4/MLL (der4) und MLL/AF4 (der11) und zur Ausbildung einer Hochrisiko-Leukämie (Behm *et al.*, 1996; Heerema *et al.*, 1999). Generell wird für *MLL* Translokationen angenommen, dass nur eines der beiden Fusionsproteine für die Entstehung der Leukämie verantwortlich ist. Für einige Translokationen konnte bereits onkogenes Potential des der11 Proteins (MLL_N/Translokationspartner) gezeigt werden (Birke *et al.*, 2002). Bei der Translokation t(4;11) ist die Lage nicht ganz so eindeutig. Für das der11 Protein MLL/AF4 konnte schwaches onkogenes Potential nachgewiesen werden (Chen *et al.*, 2006; Metzler *et al.*, 2006). Ebenso wurde kürzlich ein erstes Mausmodell für ein Mll/Af4 Fusionsallel etabliert (Krivtsov *et al.*, 2008). Auf der anderen Seite konnte für das der4 Protein AF4/MLL der Translokation t(4;11), ein starkes onkogenes Potential nachgewiesen werden (Bursen *et al.*, 2004; Gaussmann *et al.*, 2007). Zudem ist es innerhalb unserer Arbeitsgruppe gelungen ein Mausmodell mit einem ALL Krankheitsphänotyp alleinig durch Expression des AF4/MLL Fusionsproteins zu etablieren (Bursen *et al.*, 2009).

Das AF4/MLL Fusionsprotein weist in seinem N-Terminus zwei konservierte Domänen des AF4 Proteins auf: die N-terminale Homologie-Domäne NHD sowie die ALF-Domäne, welche das Erkennungsmotiv für die E3-Ligasen SIAH 1 und 2 beinhaltet. Darauf folgen mit den PHD-Fingern 1-3 bereits die ersten Domänen des MLL Proteins. Alle weiteren C-terminalen Domänen des MLL Proteins sind ebenfalls im der4 Protein enthalten. Demzufolge besitzt es die für die Hydrolyse des Proteins essentiellen Schnittstellen CS1 und CS2, welche spezifisch von der Protease Taspase 1 erkannt und prozessiert werden (Hsieh *et al.*, 2003b). Es konnte gezeigt werden, dass auch das der4 einer Prozessierung durch die Taspase 1 unterliegt (Bursen *et al.*, 2004). Zusätzlich verfügt das Fusionsprotein über die intramolekularen Interaktionsdomänen des MLL Proteins, welche eine Assemblierung der durch Proteolyse gebildeten Proteinfragmente der4_N und MLL_C ermöglichen. Diese Komplexbildung führt letztendlich zur Transformation der betroffenen Zellen. Der Komplex wird zwar von den E3 Ligasen SIAH 1 bzw. 2 erkannt, jedoch erfolgt kein proteasomaler Abbau des Fusionsproteins. Die Akkumulation des

Komplexes ist ein wichtiger Schritt zur Entartung der Zelle. Eine Möglichkeit, diesen onkogenen Prozess zu blockieren, besteht in der Inhibition der intramolekularen Proteininteraktion. Können die Proteinfragmente der4_N und MLL_C keine Interaktion mehr eingehen, können möglicherweise die onkogenen Effekte verhindert bzw. aufgehalten werden. Aus diesem Grund bestand die erste Aufgabe der vorliegenden Arbeit darin, die Interaktionsdomänen des MLL Proteins (und damit gleichermaßen des der4 Proteins) in ihrer Größe zu minimieren. Die minimierten Interaktionsdomänen sollten im Anschluss dazu verwendet werden, das Potential einer Interaktionsinhibition zu evaluieren.

4.1 Identifikation der minimalen Proteininteraktionsdomänen des MLL Proteins

In der Literatur gab es bereits 2 Publikationen, welche sich mit der intramolekularen Proteininteraktion des MLL Proteins beschäftigen. Yokoyama *et al.* beschrieben im Jahr 2002 die Interaktionsdomänen und gaben im MLL N-Terminus einen Bereich von Aminosäure 1253 – 2254 als essentiell an. Die C-terminale Interaktionsdomäne umfasst laut dieser Veröffentlichung lediglich die in der Literatur beschriebene FYRC (AS 3656 - 3812) Domäne. Im folgenden Jahr publizierten Hsieh *et al.* Studien bezüglich der Prozessierung und der nachfolgenden Interaktion des MLL Proteins. In dieser Publikation wird für die Interaktion ein Bereich im N-Terminus des MLL Proteins von AS 1975 – 2158 angegeben, der definierte C-terminale Interaktionsbereich erstreckt sich über die Domänen FYRC und SET (AS 3656 - 3969). Aufgrund der offensichtlich unterschiedlichen Angaben bezüglich der minimalen Kontaktdomänen musste zunächst geklärt werden, ob beide Publikationen miteinander in Einklang gebracht werden können und eine weitere Verkleinerung der Interaktionsdomänen überhaupt möglich war.

Die ersten Interaktionstests wurden mit Fragment-Kombinationen durchgeführt, welche anhand der genannten Publikationen ausgewählt wurden. Das N-terminale Fragment FYRN03 wurde gegen die beiden C-terminalen Fragmente FYRC/SET und FYRC/SET Δ 150 getestet. Die Interaktionsanalyse wurde unter Einsatz des *BacterioMatch® II Two-Hybrid System Vector Kit* von Stratagene durchgeführt. Mit diesem System ist eine recht einfache und schnelle Beurteilung potentieller Proteininteraktionen möglich. Durch Bereitstellung eines speziell modifizierten Reporterstamms in Kombination mit einem 2-Vektoren-System, bietet es die Möglichkeit, Interaktionen von Proteinen nach Co-Transformation anhand zweier verschiedener Reportergene nachzuweisen. Auf diese Weise können die erhaltenen Ergebnisse im gleichen System (ohne zusätzliche Klonierungsschritte etc.) verifiziert werden. Es zeigte

sich, dass beide Fragment-Kombinationen ein bakterielles Wachstum auf Selektionsplatten ermöglichen. Demzufolge ist das FYRN03 Fragment in der Lage, sowohl mit dem längeren FYRC/SET Fragment als auch mit dem verkürzten FYRC/SET Δ 150 eine Interaktion einzugehen.

Die Stärke des bakteriellen Wachstums auf 3-AT Selektionsplatten ist ein indirektes Anzeichen für die Stärke einer vorliegenden Proteininteraktion. Bei einer stabilen Proteininteraktion kommt es zu einer konstanten Expression des *HIS3* Gens, so dass die Bakterien trotz Anwesenheit des kompetitiven Inhibitors 3-AT auf Histidin-Mangelmedium wachsen können. Ein erhöhtes Wachstumspotential liegt daher in der Menge des gebildeten *HIS3* Genprodukts begründet, welche im direkten Zusammenhang mit der Interaktionsstärke der beiden analysierten Proteine steht. Dementsprechend belegen die Resultate, dass die Interaktion von FYRN03 mit FYRC/SET Δ 150 stärker ausgeprägt ist als die Interaktion mit FYRC/SET.

Auf den ersten Blick ist es fraglich, weshalb die ausgewählten Fragment-Kombinationen eine Interaktion aufweisen, wenn beide Publikationen mit kleineren als den von ihnen präsentierten Domänen keine Interaktion mehr nachweisen konnte. Die Tatsache, dass bei den durchgeführten Versuchen die größeren Fragmente eine schwächere Interaktion zeigen, kann einen Erklärungsansatz liefern. Vermutlich nehmen Fragmente eines bestimmten (jedoch nicht exakt definierten) Größenbereichs eine Konformation ein, welche bei Kombination mit bestimmten anderen Fragmenten keine Interaktion zulässt. Zusammengenommen zeigen die hier präsentierten Ergebnisse und die Daten der beiden Publikationen, dass lediglich Fragmente eines bestimmten (mittleren) Größenbereichs bei Kombination keine Interaktion aufweisen, während sowohl größere (siehe Publikationen) als auch kleinere Fragmente (siehe diese Arbeit) interagieren. Es ist anzunehmen, dass die nachgewiesene Interaktion die natürliche Situation des MLL Proteins widerspiegelt.

Die weiteren Proteininteraktionsanalysen zur Minimierung des Interaktionsinterface wurden in humanen HeLa Zellen durchgeführt. Dies bietet den Vorteil, dass mögliche Modifikationen der Proteinfragmente analog zum Wildtyp Protein vollzogen werden können. Das verwendete zellbasierte Protein-Translokation-Biosensor-System nutzt den regulierten Transport innerhalb humaner Zellen in Kombination mit der einfachen und schnellen Detektion fluoreszierender Proteine. Die zu untersuchenden Proteine werden hierbei mit einem von zwei möglichen Markerproteinen fusioniert, so dass ihre Lokalisation innerhalb der Zellen bestimmt werden kann. Durch passend ausgewählte Lokalisationssignale findet eine Co-Lokalisation der Markerproteine nur bei Interaktion der fusionierten Proteinfragmente statt. Um mit dem System vertraut zu werden,

erfolgten die ersten Versuche mit den interagierenden MLL Fragmenten FYRN03, FYRC/SET und FYRC/SET Δ 150. Interessanterweise konnte in diesem zellbasierten System lediglich die Interaktion des kürzeren C-terminalen MLL Fragments FYRC/SET Δ 150 mit dem N-terminalen FYRN03 nachgewiesen werden. Das Fragment FYRC/SET, welches auch im B2H-System eine deutlich schwächere Interaktion aufwies, zeigte keine Co-Lokalisation mit FYRN03. Eine mögliche Erklärung für den Übergang einer schwachen Interaktion zu einer nicht vorhandenen Interaktion findet sich in der Nachweismethode des verwendeten Testsystems. Während im B2H-System eine schwache (vorübergehende) Interaktion bereits die Expression des Reportergens bewirkt und somit ein Wachstum der Bakterien ermöglicht wird, kann eine Co-Lokalisation der Markerproteine bei einer extrem schwachen Interaktion im zellbasierten PTB-System nicht detektiert werden, da sie vermutlich nicht dauerhaft vorhanden ist.

Die mittels B2H-System und zellbasierten PTB-System bestimmten Interaktionsdomänen FYRN03 (Aminosäure Position im MLL Protein: 1864 – 2161) und FYRC/SET Δ 150 (Aminosäure Position im MLL Protein: 3656 – 3812) konnten im Folgenden als Grundlage für die Erzeugung neuer Testfragmente angewendet werden. Es wurde eine Analyse der Fragmente bezüglich ihrer Aminosäure-Komposition sowie der Existenz potentieller struktureller Elemente durchgeführt, welche in der Aufstellung eines hypothetischen Interaktionsinterface resultierte. Daraus folgernd wurden schrittweise verkleinerte MLL Fragmente des N-Terminus und des C-Terminus auf ihre Interaktion überprüft. Gleichzeitig wurde durch die Interaktionsanalyse verschiedenster Fragment-Kombinationen die potentielle Interaktionsstruktur überprüft. Die Resultate lassen vermuten, dass die Interaktion des MLL N-Terminus mit dem MLL C-Terminus über die hier vorgestellte Struktur stattfindet (siehe Abbildung 3-10 bzw. 3-13), welche jedoch nicht die minimalen Interaktionsdomänen widerspiegeln. Den Resultaten ist zu entnehmen, dass das N-terminale Fragment FYRN_A3 mit einer Größe von nur noch 58 AS (Position im MLL Protein AS 1991 – 2048) zusammen mit dem C-terminalen Fragment FYRC_B3 mit einer Größe von 56 AS (Position im MLL Protein AS 3697 – 3752) die kleinste Fragment-Kombination repräsentiert, welche weiterhin in der Lage ist, eine stabile Interaktion einzugehen. Die Fragmente FYRN_A5 und FYRC_B5, welche jeweils ein Teilfragment der Fragmente FYRN_A3 bzw. FYRC_B3 sind, zeigen bei Analyse im zellbasierten System weiterhin eine Interaktion, jedoch findet keine vollständige Translokation des GFP Markerproteins an die Nukleoli der Zelle mehr statt. Diese unvollständige Translokation kann damit begründet werden, dass die Interaktion der verkürzten Fragmente vergleichsweise schwächer ist. Es scheint, dass eine

Interaktion bei weiterer Verkleinerung nicht mehr möglich ist. Die Intention der vorliegenden Arbeit war es, das minimale Interaktionsinterface zu bestimmen, um Untersuchungen bezüglich einer möglichen Inhibition dieser Interaktion durchzuführen. Für entsprechende Experimente stellt eine stabile Interaktion eine Grundvoraussetzung dar.

Gegensätzlich zu den für diese Arbeit grundlegenden Publikationen, welche bei zunehmender Verkleinerung der Interaktionsbereiche nicht mehr in der Lage waren, eine Interaktion nachzuweisen, konnte unter Anwendung des zellbasierten PTB-Systems der N-terminale Interaktionsbereich auf eine Größe von 58 AS, der C-terminale Interaktionsbereich auf eine Größe von 56 AS eingegrenzt werden.

4.2 Interaktion des FYRC_B3 Fragments mit den *full length* Proteinen MLL und der4

Die Minimierung der Interaktionsdomänen diente als Grundlage für Versuche, welche sich mit der Inhibition dieser Interaktion beschäftigten. Während der Interaktionsanalysen wurden bei Expression verschiedener C-terminaler MLL Fragmente ungewöhnliche Akkumulationen des GFP Markerproteins beobachtet. Da diese Fragmente nachgewiesenermaßen mit einem Bereich des MLL N-Terminus interagieren können, lag die Vermutung nahe, dass die Akkumulationen auf Interaktion mit endogenem MLL Protein beruht. Zusätzlich zeigten im besonderen Zellen, welche das FYRC_B3 Fragment exprimierten, morphologische Veränderungen (starkes Abrunden, Zusammenziehen der Membran) bis hin zu einem Ablösen von der Zellkulturschale. Dies war ein deutliches Anzeichen für ein Absterben der Zellen. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Zellen bei Expression des FYRC_B3 Fragments durch dessen Interaktion mit dem endogenen MLL Protein, und damit der Inhibition der Komplexbildung von MLL_N und MLL_C, absterben. Da das der4 Protein gleichermaßen die für die Interaktion nötigen Bereiche aufweist, sollte auch hier eine Interaktion mit dem Proteinfragment auftreten, welche die transformierende Komplexbildung des der4_N Fragments mit dem MLL_C Fragmente inhibieren könnte.

Für die Prüfung der Hypothese wurde im ersten Schritt die Interaktion des FYRC_B3 Fragments mit den *full length* Proteinen MLL und der4 untersucht. Der Interaktionsnachweis erfolgte über Co-Immunopräzipitationsexperimente. Sowohl bei Präzipitation des MLL Proteins als auch bei Präzipitation des der4 Proteins konnte das FYRC_B3 Fragment co-präzipitiert werden. Die Spezifität der Versuche wurde durch entsprechende Kontrollen verifiziert. Die umgekehrte Versuchsdurchführung, Co-Präzipitation von MLL bzw. der4 bei Präzipitation von FYRC_B3 wurde nicht

durchgeführt, da es bekanntermaßen sehr schwierig ist, Proteine dieser Größe (etwa 300 kDa für MLL_N) per Western Blot zu detektieren und die Ergebnisse der ersten Co-Immunopräzipitation inklusive aller Kontrollen unwiderlegbar sind.

Um einen Eindruck zu bekommen, welche Auswirkungen eine mögliche Interaktion des FYRC_B3 Fragments mit MLL_N bzw. der4_N auf die Abundanz und die Lokalisation beider nativer Proteinfragmente (MLL_N und MLL_C sowie der4_N und MLL_C) hat, wurde als zweiter Versuchsansatz erneut die Fluoreszenz-Mikroskopie an lebenden Zellen ausgewählt. MLL und AF4/MLL, welche sowohl an ihrem N-Terminus als auch an ihrem C-Terminus mit einem Fluoreszenzprotein fusioniert wurden, wurden zusammen mit dem FYRC_B3 Fragment (ebenfalls farbmarkiert) in HeLa Zellen exprimiert. Bereits vor der eigentlichen Versuchsdurchführung wurden hier jedoch experimentelle Probleme deutlich. Bei Expression der doppelt-farbmarkierten Proteine MLL und AF4/MLL zeigte sich, dass sich die Detektion der Markerproteine mit dem vorhandenen Fluoreszenz-Mikroskop aufgrund einer sehr schwachen Fluoreszenzintensität als äußerst schwierig erwies. Dies liegt möglicherweise in der extremen Größe der beiden Proteine MLL (450 kDa) und AF4/MLL (365 kDa) begründet, wodurch die Menge des fusionierten Fluoreszenzmarkers verhältnismäßig gering bleibt. Eine schwache Fluoreszenz führt dazu, dass die Zellen entsprechend längeren Belichtungszeiten ausgesetzt werden müssen, um eine Detektion zu ermöglichen. Lange Belichtungszeiten führen ihrerseits jedoch zu einem beschleunigten Photobleaching der Proteine und zu einer hohen Hintergrundfluoreszenz. Selbstverständlich wird die benötigte Belichtungszeit zusätzlich verlängert, sobald zur Lokalisation des FYRC_B3 Fragments noch ein weiteres Markerprotein detektiert werden muss. Diese Problematik wird dadurch verstärkt, dass nicht nur für die Auffindung einer passenden Zelle, sondern gleichermaßen für die Dokumentation der Situation die Fluoreszenz benötigt wird. Werden in einer Zelle drei Fluoreszenzproteine exprimiert, so muss zur Dokumentation jedes einzelne mit der optimalen Wellenlänge für einen optimalen Zeitraum angestrahlt werden. Da jedoch die Fluoreszenz von Grund auf relativ gering ist, gelingt es teilweise nicht, alle Fluoreszenzproteine zu detektieren, bevor eines ausgebleicht ist. Dies macht die Auswertung dieser Versuche äußerst schwierig. Um mit dieser Methode optimal arbeiten zu können, wäre es von großem Vorteil, Fluoreszenzproteine nutzen zu können, welche für verlängerte Expositionszeiten noch weniger anfällig sind. Da insgesamt drei verschiedene Markerproteine benötigt werden, ist diese Aufgabe recht schwierig. Bei der Auswahl der Proteine muss gleichermaßen darauf geachtet werden, dass die spezifischen Exzitations- und Emissionsmaxima sich so weit unterscheiden, dass sie unabhängig voneinander detektiert werden können. Das verwendete mCherry Protein

stellt eine Variante des *Red Fluorescent Protein* RFP dar, welche speziell zur Verbesserung der Fluoreszenzintensität und zur Reduktion des Photobleaching entwickelt wurde (Shaner *et al.*, 2004). Ebenso handelt es sich bei den verwendeten BFP und GFP Varianten (BFPsg50, GFPsg25) um modifizierte Proteinformen, welche eine erhöhte Fluoreszenzintensität sowie eine verminderte Anfälligkeit für Photobleaching aufweisen (Stauber *et al.*, 1998). Trotz der sorgsam Auswahl der Fluoreszenzproteine erwiesen diese sich bei der Versuchsdurchführung nicht als optimal. Möglicherweise könnte eine veränderte Verteilung der Markerproteine zur Optimierung des Experiments beitragen. Erfahrungsgemäß wies BFP die schwächste Fluoreszenz auf, so dass eine Fusion mit dem kurzen FYRC_B3 Fragment von Vorteil sein könnte. Zusätzlich könnten die kodierenden Sequenzen der N-terminalen Proteinfragmente (MLL_N sowie der4_N) und der C-terminalen Proteinfragmente (in beiden Fällen MLL_C) über zwei separate Plasmide in die Zellen eingebracht werden. In diesem Fall wäre eine Dreifach-Transfektion nötig, um eine Co-Expression aller drei Fragmente zu erreichen. Da bei dieser Prozedur jedoch nicht von allen Zellen alle drei Plasmide aufgenommen werden, würde erneut die benötigte Belichtungszeit durch die Suche nach passenden Zellen verlängert, was erneut die beschriebenen Probleme mit sich bringen würde.

Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche veranlassen durchaus zur Optimierung der experimentellen Bedingungen. Bei den zu Beginn vorgenommenen Expressionstests der doppelt-farbmarkierten Proteine zeigten die Proteinfragmente des MLL Proteins MLL_N und MLL_C eine Co-Lokalisation innerhalb des Zellkerns. Eine entsprechende Verteilung wurde ebenfalls von Hsieh *et al.* 2003 in einer Publikation gezeigt. Bei Analyse der der4 exprimierenden Zellen zeigte sich hingegen kein einheitliches Bild. Wider Erwarten sind die beiden Fragmente der4_N und MLL_C in den meisten Zellen unabhängig voneinander lokalisiert, obwohl mithilfe von Co-Immunopräzipitationsstudien gezeigt werden konnte, dass die beiden Proteinfragmente innerhalb von Zellen miteinander interagieren (Bursen *et al.*, 2004). Während das BFP (und damit der C-Terminus des der4 Proteins MLL_C) innerhalb des Zellkerns lokalisiert ist, kann das mCherry Protein (= der4_N) im Cytoplasma detektiert werden. Nur in wenigen Zellen finden sich beide Markerproteine gemeinsam innerhalb des Nukleus wieder. Die fehlenden nukleären Lokalisationssequenzen innerhalb des der4 Proteins lassen jedoch die Frage aufkommen, weshalb überhaupt eine nukleäre Lokalisation des Proteins zustande kommt. Die NLS des AF4 Proteins befindet sich in dessen C-Terminus, während sich die NLS des MLL Proteins im N-Terminus befindet. Dementsprechend ist keine der beiden Lokalisationssequenzen im der4 Fusionsprotein enthalten. Frühere Untersuchungen

bezüglich der Lokalisation der MLL Proteinfragmente zeigten für MLL_C in Abwesenheit von MLL_N ebenfalls eine nukleäre Lokalisation, obgleich auch hier die nukleäre Lokalisationssequenz fehlt (Hsieh *et al.*, 2003b). Nach beschriebener Optimierung der experimentellen Bedingungen kann das zweifarbige der4 Protein ein sehr nützliches Tool darstellen, um die tatsächliche Lokalisation des Proteins bzw. seiner einzelnen Fragmente innerhalb von Zellen zu untersuchen.

Die Interaktionsstudien von FYRC_B3 mit mCherry-MLL-BFP zeigten keine Co-Lokalisation der Markerproteine mCherry und GFP, welche bei Interaktion von FYRC_B3 mit MLL_N zu erwarten wäre. Zeigten Zellen die Expression aller 3 Fluoreszenzproteine, konnte GFP im Cytoplasma detektiert werden, während mCherry und BFP mehr oder weniger gemeinsam im Zellkern zu finden waren. Eine mögliche Erklärung für die fehlende Interaktion in diesem zellulären Kontext trotz nachgewiesener Interaktion über die Co-Immunopräzipitationsversuche, liegt in einer Beobachtung, die Hsieh *et al.* 2003 publizierten. Die Autoren konnten zeigen, dass nur bei bestehender Interaktion zwischen MLL_N und MLL_C beide Proteinfragmente detektiert werden können. Ist die Interaktion verhindert (bei den publizierten Experimenten durch fehlende FYRC/SET-Domäne oder im vorliegenden Fall durch potentielle Interaktion mit FYRC_B3), kann lediglich MLL_C, jedoch nicht MLL_N detektiert werden. Die Interaktion mit MLL_C scheint das MLL_N Proteinfragment vor einer Degradation zu schützen. Bei der mikroskopischen Analyse der co-transfizierten Zellen wurde ausschließlich auf jene geachtet, welche alle drei Fluoreszenzproteine aufweisen. Es ist demnach denkbar, dass die betrachteten Zellen nur einen bestimmten Zustand der Zellen repräsentieren, in dem die Interaktion (noch) nicht inhibiert ist. Bei weiteren Versuchen müsste der Fokus gleichermaßen darauf gelegt werden, ob viele Zellen nur die Markerproteine GFP und BFP aufweisen. Dies wäre zu erwarten, wenn durch Interaktion von FYRC_B3 mit MLL_N die Interaktion mit MLL_C verhindert und damit gleichzeitig dessen stabilisierende Effekte aufgehoben wären.

Bei Auswertung des Interaktionstests von mCherry-der4-BFP mit FYRC_B3 bestand die zusätzliche Problematik, dass in sehr vielen Zellen keine Interaktion des der4_N Fragments mit dem MLL_C Fragmente bestand. Dementsprechend konnte durch Betrachtung dieser Zellen keine Aussage über eine mögliche Interaktionsinhibition getätigt werden. Die diffuse Verteilung des mCherry Proteins im Cytoplasma der Zellen macht gleichermaßen eine Aussage bezüglich der Interaktion mit dem FYRC_B3 Fragment recht schwierig. Dieses ist ebenfalls im Cytoplasma zu finden. Da jedoch keine distinkte Lokalisation vorliegt, kann eine Interaktion vermutet, aber nicht eindeutig bestätigt werden. Zellen, welche eine Interaktion der der4 Proteinfragmente zeigten,

ließen keine Interaktion von der4_N mit FYRC_B3 erkennen. Während sowohl mCherry als auch BFP, und damit der4_N und MLL_C, innerhalb des Zellkerns detektiert wurde, findet sich das GFP ausschließlich im Cytoplasma der Zellen. Möglicherweise wurde auch hier nur ein spezifischer Moment detektiert, zu dem noch keine Interaktionsinhibition stattgefunden hat. Aufgrund der Resultate der Co-Immunopräzipitationen, welche eine Interaktion des der4 Proteins mit dem FYRC_B3 Fragment belegen, wird jedoch davon ausgegangen, dass die Interaktion trotz der hier erhaltenen Resultate besteht.

Für alle weiteren Versuche ist es unabdingbar, die experimentellen Bedingungen zu optimieren. Mit den gegebenen Möglichkeiten kann keine repräsentative Anzahl von Zellen ausgewertet werden, die definitive Interpretationen zulassen.

4.3 Die Expression verschiedener MLL Fragmente hat ein Absterben der Zellen zur Folge

Nachdem die Interaktion des FYRC_B3 Fragments mit den *full length* Proteinen MLL sowie AF4/MLL durch Co-Immunopräzipitationsversuche nachgewiesen wurde, sollte die potentielle Letalität der erzeugten MLL Fragmente genauer beleuchtet werden. Die negativen Auswirkungen einzelner MLL Fragmente spiegeln sich in extremen morphologischen Veränderungen der HeLa Zellen wider. Aus diesem Grund wurde die Anzahl toter Zellen infolge der Expression verschiedener MLL Fragmente (alleine oder in Kombination) per optischer Bewertung bestimmt. Als Referenz wurden untransfizierte Zellen betrachtet. Die Auswertung erfolgte in der Art, dass eine bestimmte Anzahl transfizierter (grüner) Zellen ausgezählt wurden und der prozentuale Anteil toter Zellen bestimmt wurde. Zellen wurden bereits als tot gewertet, sobald sie deutliche Änderungen in ihrer Morphologie erkennen ließen, welche für ein Absterben sprechen. Bei den verwendeten adhärenenten HeLa Zellen gestaltet sich die Unterscheidung aufgrund der natürlichen Morphologie recht einfach.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Expression des FYRC_B3 Fragments eine extrem hohe Sterberate zur Folge hat. 48 Stunden nach Transfektion lag der Anteil toter Zellen bei bis zu 85%. Diese starken Effekte waren deutlich reduziert, sobald eine Co-Expression des FYRN_A3 Fragments vorlag. Vermutlich ist die Interaktion der beiden Fragmente für die Reduzierung verantwortlich, da demgemäß weniger freies FYRC_B3 Protein in den Zellen vorliegt. Eine alleinige Expression des FYRN_A3 Fragments hatte vergleichbare Effekte zur Co-Expression. Interessanterweise war der Anteil toter Zellen bei Expression der C-terminalen MLL Proteinfragmente generell höher, als bei Expression der N-terminalen Gegenstücke oder bei Co-Expression zweier Proteinfragmente. Die

Plasmide des zellbasierten PTB-Systems bewirken durch unterschiedliche Lokalisationssequenzen distinkte Lokalisationen der jeweiligen Proteine. Während die C-terminalen Fragmente durch gleichzeitige Fusion an eine NLS wie auch eine NES in der Lage sind zwischen Zellkern und Cytoplasma zu pendeln, werden die N-terminalen Fragmente über eine starke NLS innerhalb des Zellkerns festgehalten. Um einen Eindruck zu bekommen, inwiefern die Lokalisation des jeweiligen Fragments die Effekte desselben beeinflusst, wurde das FYRC_B3 Fragment über verschiedene Plasmide in Zellen eingebracht, welche unterschiedliche Lokalisationen des Proteins bedingen. Ist das Protein in der Lage zwischen Zellkern und Cytoplasma zu pendeln, hat dies für die Zellen die negativsten Auswirkungen. Dies lässt vermuten, dass Interaktionen mit zellulären Proteinen in beiden Zellkompartimenten stattfinden. Da bei Retention des Proteins innerhalb des Zellkerns die Effekte stark abgeschwächt sind, scheint jedoch die Interaktion im Cytoplasma gravierendere Auswirkungen zu haben. Möglicherweise interferiert das Proteinfragment bereits bei bzw. kurz nach der Translation des nativen MLL Proteins, so dass die natürlichen Aufgaben von Beginn an unterbunden werden, während bei Retention im Zellkern die Wirkungen des *full length* Proteins erst zu einem weitaus späteren Zeitpunkt gestört werden. Dies könnte den unterschiedlichen Grad der Auswirkungen erklären.

Bei dieser Auswertungsmethode ist nicht auszuschließen, dass Zellen fälschlicherweise als tot bzw. lebend gewertet werden. Da dieser Fehler jedoch bei allen Proben gleichermaßen auftritt, kann er vernachlässigt werden. Die aufgeführten Werte sollen zudem nicht als absolute Resultate betrachtet werden. Das Hauptaugenmerk soll vielmehr auf der grundsätzlichen Tendenz liegen, welche Fragmente welche Effekte aufweisen. Dies ist durch diese Versuche zweifelsohne aufgezeigt.

Da bei den Co-Immunopräzipitationen ebenfalls für das AF4/MLL Fusionsprotein eine Interaktion mit dem FYRC_B3 Fragment gezeigt werden konnte, sollte gleichermaßen untersucht werden, ob die C-terminalen MLL Proteinfragmente auch auf t(4;11)-positive SEM Zellen letale Auswirkungen haben. Da eine optische Bewertung aufgrund der natürlichen Morphologie von SEM Zellen nicht möglich war, und um mögliche Fehler dieser Methode zu umgehen, wurden die folgenden Versuche unter Verwendung von Propidiumiodid (PI) und nachfolgender Analyse im Durchflusscytometer durchgeführt. Es handelt sich bei PI um einen Farbstoff, welcher in die DNA einer Zelle interkaliert. Da PI Membran impermeabel ist, wird es von lebenden Zellen ausgeschlossen und färbt folglich spezifisch tote Zellen an. Nach Transfektion der Zellen, gefolgt von einer PI-Färbung, konnten die GFP und PI positiven Zellen mittels Durchflusscytometrie bestimmt werden.

Für diese Versuche wurden alle generierten C-terminalen MLL Proteinfragmente verwendet. Die Ergebnisse der durchflusscytometrischen Analyse stimmen im Fall der HeLa Zellen mit den Resultaten des ersten Versuchs überein. Erneut erwies sich das FYRC_B3 Fragment als stärkster Effektor, dessen Expression in einem Anteil von bis zu 85% toter Zellen 48h nach Transfektion resultiert. Generell scheinen jedoch alle C-terminalen MLL Proteinfragmente für die Zellen letal zu sein, wenngleich sich das FYRC_B2 Fragment als schwächster Effektor heraus stellt. Die unterschiedliche Ausprägung der Effekte ist vermutlich auf unterschiedlich starke Affinitäten des jeweiligen Fragments zum nativen MLL Protein zurückzuführen. Möglicherweise ist diese im Fall des FYRC_B2 Fragments aufgrund der Fragmentlänge (mit 84 AS das größte Fragment) am niedrigsten ausgeprägt. Die Tatsache, dass die kürzesten Fragmente FYRC_B4 (28 AS) und FYRC_B5 (26 AS) schwächere Effekte hervorrufen als FYRC_B3 (56 AS), bestätigt die Resultate der Interaktionstests. Bei diesen wurde beobachtet, dass die Interaktion bei zu starker Verkleinerung instabil wird. Auch die Interaktion mit dem nativen MLL Protein scheint schwächer zu sein.

Die wichtigste Erkenntnis bei Analyse der transfizierten SEM Zellen war, dass es generell möglich ist, durch Expression der MLL Proteinfragmente ein Absterben der Zellen zu bewirken. t(4;11)-positive Zellen erweisen sich typischerweise als therapieresistent.

Im Gegensatz zu den Resultaten der HeLa Zellen zeigte sich bei Untersuchung der SEM Zellen das FYRC_B1 Fragment als stärkster Effektor, während das in HeLa Zellen wirksamste FYRC_B3 Fragment durchschnittliche Auswirkungen hatte (70% bzw. 55% tote Zellen 48h nach Transfektion). Es ist nicht klar, wie diese unterschiedlichen Ausprägungen zustande kommen. Die schwächsten Auswirkungen zeigte auch bei den SEM Zellen das FYRC_B2 Fragment.

Grundsätzlich gilt für die Experimente mit SEM Zellen, dass die Transfektionseffizienz deutlich verbessert werden muss. Obgleich die Analyse im Durchflusscytometer bereits die Möglichkeit bietet, eine extrem hohe Anzahl von Zellen auszuwerten, müssen die experimentellen Bedingungen optimiert werden, um die Verlässlichkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Derzeit wird in unserem Labor die Möglichkeit der Einschleusung von Proteinen über Penetratin ausgetestet (Derossi *et al.*, 1994). Erste Versuche zur Penetration der MLL Proteinfragmente auf diesem Weg blieben jedoch erfolglos (Daten nicht gezeigt).

Abschließend kann festgehalten werden, dass die Expression von MLL Proteinfragmenten ein Absterben der Zellen zur Folge hat. Ein besonderer Focus liegt dabei auf t(4;11)-positiven Zellen, welche naturgemäß eine recht starke Apoptose-

Resistenz aufweisen und sich bei Therapien als sehr resistent gegenüber den gängigen Chemotherapeutika erweisen (Gaussmann *et al.*, 2007; Heerema *et al.*, 1999). Dementsprechend spricht ein Absterben dieser Zellen für einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz zur Behandlung t(4;11)-positiver Leukämien. Da jedoch bei Verabreichung eines Therapeutikums nicht ausschließlich die Leukämiezellen betroffen wären, sollte untersucht werden, wie sich die MLL Fragmente auf Knochenmarkstammzellen auswirken. Da MLL bereits bei der Differenzierung der Zellen eine Rolle spielt, muss geklärt werden, ob die Entwicklung in Anwesenheit eines entsprechenden Peptids weiterhin stattfinden kann. Diese Problematik besteht grundsätzlich bei allen Therapeutika, nichtsdestotrotz sollten die Auswirkungen auf gesunde Knochenmarkszellen gründlich untersucht werden.

4.4 Diskussion des Modell zur Entstehung letaler Effekte durch Expression verschiedener MLL Proteinfragmente

Aufgrund der nachgewiesenen Interaktion von FYRC_B3 mit den *full length* Proteinen MLL und AF4/MLL ist es sehr wahrscheinlich, dass die Auswirkungen dieses Fragments (und anderer C-terminaler MLL Fragmente) auf die betroffenen Zellen auf dieser Interaktion beruhen. Während der Interaktionsstudien wurde für das FYRC_B3 Fragment eine Interaktion mit dem N-terminalen Gegenstück FYRN_A3 nachgewiesen. Dementsprechend kann davon ausgegangen werden, dass die Interaktion von FYRC_B3 mit MLL_N und der4_N über genau diesen Bereich vermittelt wird. Dies wiederum bedeutet, dass die Interaktionsstelle für MLL_C bereits belegt ist, und somit kein Komplex aus den beiden nativen Proteinfragmenten gebildet werden kann. Die fehlende Komplexbildung stellt somit vermutlich die Grundlage für ein Absterben der Zellen dar. Im Normalfall stellt der Komplex aus MLL_N und MLL_C bzw. der4_N und MLL_C die Basis für die Ausbildung eines Multiproteinkomplexes dar. Die Verhinderung der Komplexbildung wirkt sich dementsprechend auf die Funktion vieler weiterer Proteine aus.

Untersuchungen mit doppelt-farbmarkiertem MLL bzw. AF4/MLL Protein könnten einen wichtigen Beitrag zur Bestätigung dieses Modells liefern. Wie beschrieben, ist es dafür unerlässlich, die experimentellen Bedingungen deutlich zu verbessern.

5 MATERIAL UND METHODEN

5.1 Materialien

5.1.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Geräte und ihre Bezugsquellen

CHEMIKALIEN	BEZUGSQUELLE
β -Mercaptoethanol	Roth
λ -DNA	MBI Fermentas
3-Amino-1,2,4-Triazol	Sigma
6-Aminohexansäure	Sigma
Acrylamid	Roth
Adenin HCl	Sigma
Agarose	Invitrogen
Ampicillin	Roth
APOD	Roth
Bacto Agar	Sigma
Bacto Pepton	Difco
Bacto Trypton	Difco
Bisacrylamid	Roth
Bromphenolblau	Sigma
BSA Fraktion V (für Blockierlösungen)	Roth
BSA (für Restriktionsverdau)	NEB
CaCl_2	Merck
CAPS	Roth
Chloramphenicol	Roth
Coomassie Brilliant Blue	Roth
DABCO	Roth
DMSO	Sigma
dNTPs	Roche
DTT	Roth
EDTA	Roth
Essigsäure	Roth
Ethanol 96% (reinst)	Roth
Ethidiumbromid	Sigma

Glucose	Roth
Glycerin 86%	Roth
H ₃ BO ₃	Roth
HEPES	Roth
Hi-Di™ Formamide	Applied Biosystems
His Dropout Supplement	BD Clontech
IPTG	Saxon
Kanamycin	Roth
KAc	Roth
KCl	Roth
KH ₂ PO ₄	Merck
Lipofectamin	Invitrogen
Lysozym	Sigma
Methanol	Roth
MgCl ₂	Merck
MgSO ₄	Merck
MG132	Calbiochem
Mowiol	Roth
NaAc	Roth
NaBH ₄	Roth
NaCl	Roth
NaOH	Roth
NaF	Riedel-de Haën
Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O	Merck
Na ₃ VO ₄	Sigma
NH ₄ Cl	Roth
Paraformaldehyd	Sigma
PEI	Sigma Aldrich
PMSF	Sigma
Ponceau S	Sigma
Propidiumiodid	Sigma
Protease Inhibitor Mix	Calbiochem
Protein G-Agarose	Sigma
Röntgen-Fixierlösung	Tetenal
Röntgen-Rapid-Entwickler	Tetenal
Saccharose	Roth

Material und Methoden

SDS	Biomol
Streptomycin	Roth
TEMED	Sigma
Tetracyclin	Sigma
Thiamin HCl	Sigma
Tris	Roth
Triton-X 100	Sigma
Trockenmilch (non fat)	USA (TOPS)
Tween 20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat)	Sigma
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galaktopyranosid)	Roth
Yeast Extract	Difco
ZnSO ₄	Merck

NÄHRMEDIEN UND ZUSATZSTOFFE FÜR DIE ZELLKULTUR

BEZUGSQUELLE

DMEM	PAA
FCS	Invitrogen
Glutamin	PAA
PBS	PAA
Penicillin/Streptomycin	PAA
RPMI 1640	PAA
Trypanblau	Invitrogen
Trypsin	Invitrogen

KITS UND GRÖßENMARKER

BEZUGSQUELLE

BacterioMatch®II TwoHybridSystem Vector Kit	Stratagene
Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Kit	Perkin Elmer
ECL™-Kit	Amersham
Gel Extraction Kit (QIAquick und QIAEXII)	Qiagen
Kaleidoscope™ Prestained Standard	Bio-Rad
Nucleofector Kit R	Amara
PCR Purification Kit	Qiagen
Prestained Protein Marker, Broad Range	NEB
PureYield™ Plasmid Midiprep System	Promega

ENZYME	BEZUGSQUELLE
AP (alkalische Phosphatase)	Roche
CIP (Alkalische Phosphatase, Calf Intestinal)	NEB
Klenow Large fragment	NEB
Polymerasen	
Pfu Turbo DNA Polymerase	Stratagene
TripleMaster PCR System	Eppendorf
Taq Polymerase	Promega, Invitrogen
Restriktionsendonukleasen	NEB
RNase	Sigma
T4-DNA Ligase	NEB
T4-DNA Quick Ligase	NEB
T4-Polynukleotidkinase	NEB
ANTIKÖRPER	HERSTELLER
α -MLL27.1	Eigenherstellung
α -AF4-N	Eigenherstellung
α -GFP	Santa Cruz Biotechnology
VERBRAUCHSMATERIALIEN	BEZUGSQUELLE
3mm Chromatographiepapier	Whatman
FACS Röhrchen	Sarstedt
Hybond TM -P	Amersham Biosciences
Petrischalen	Greiner
Pipetten (steril; 2, 5, 10 und 25 ml)	Corning, Roth
Reaktionsgefäße	NEB
Röntgenfilme	Fujifilm
Sterilfilter 0,2 μ m	Schleicher & Schüll
Zellkulturschalen	Cellstar, Corning

GERÄTE	FIRMA
Abi Prism 310 Genetic Analyzer	PE Applied Biosystems
Elektroblotting-Apparatur für Western Blots	Fröbel
Brutschränke	Heraeus
CASY Cellquant	Innovatis
Durchflussscytometer (CyFlow ML)	Partec
Elektrophorese-Kammern (Agarose-Gele)	B2, Owl Separation Systems
Elektrophorese-Kammern (SDS-PAGE)	Whatman, Biometra
Elektroporator Impulsgenerator EPI 2500 (Zellkultur)	Dr. L. Fischer Heidelberg
Elektroporator Gene Pulser™ (Bakterien)	Bio-Rad
Fluoreszenz-Mikroskop	Zeiss
Geltrockner	Fröbel
GeneQuant 1300 RNA/DNA Kalkulator	GE Healthcare
Gene Quant RNA/DNA Calculator	Roth
Mikroskop	Nikon
Orbitalschüttler (Rocky)	Froebel
PCR-Geräte	PE Applied Biosystems
pH-Meter	Inolab
Photoapparat (Polaroid) DS-34	Polaroid
Qiagen Gel Extraction Kit	Qiagen
Qiagen PCR Purification Kit	Qiagen
Röntgenfilme	Fujifilm
Rotationsschüttler	Infors
Spektralphotometer Hitachi U 2000	Colora
SterilGard Hood (LaminAir HB2427)	Heraeus
Thermomixer	Eppendorf
Ultraschallgerät Sonoplus HD-70	Bandelin
UV-Schirm	Life Technologies
Vortexer (REAX 2000)	Heidolph
Wasserbad	Julabo
Zellkultur-Inkubatoren	Heraeus
Zentrifugen	Eppendorf (5702, 5415) Hettich (Rotixa/P) Beckman (J2-HS, J6-HC)

5.1.2 Puffer und Lösungen

Allgemeine Puffer und Lösungen

PUFFER	ZUSAMMENSETZUNG	
2x Laemmli-Puffer	10 mM	Tris/HCl (pH 6,8)
	200 mM	DTT
	4%	SDS
	20%	Glycerin
	0,2%	Bromphenolblau
CaCl ₂ -Transformationspuffer	10 mM	Tris
	10 mM	CaCl ₂
	10 mM	MgCl ₂
E-Gel-Puffer (pH 7.9)	40 mM	Tris
	2 mM	EDTA
	0,5 mM	NaAc
lowTE	10 mM	Tris/HCl (pH 8,0)
	0,1 mM	EDTA
Lysozymlösung (für <i>boiled-lysis</i>)	1%	Lysozym (in ST-Puffer)
Puffer 1 (für DNA Mini-Präparation)	50 mM	Tris (pH 8.0)
	10 mM	EDTA
Puffer 2 (für DNA Mini-Präparation)	1%	SDS
	0,2 M	NaOH
Puffer 3 (für DNA Mini-Präparation)	3M	KAc
ST-Puffer	8%	Saccharose
	5%	Triton-X100
	50 mM	EDTA
	50 mM	Tris/HCl, pH 8,0
TBE-Puffer	100 mM	Tris
	500 mM	H ₃ BO ₃
	2,5 mM	EDTA
Anodenpuffer I (pH 10,4)	300 mM	Tris
	20% (v/v)	Methanol
Anodenpuffer II (pH 10,4)	25mM	Tris
	20% (v/v)	Methanol
Kathodenpuffer (pH 9,4)	25 mM	Tris
	40 mM	6-Aminohexansäure
	20% (v/v)	Methanol

***E. coli* Medien (allgemein)**

Alle Medien zur Kultivierung von Bakterien wurden vor dem Gebrauch autoklaviert.

MEDIUM	ZUSAMMENSETZUNG	
YT-Medium	0,5%	NaCl
	0,5%	Yeast Extract
	1%	Bacto Trypton
YT-Agar	0,5%	NaCl
	0,5%	Yeast Extract
	1%	Bacto Trypton
	1,2%	Bacto Agar
YT _{Amp} -Medium	100 µg/ml	Ampicillin
YT _{Kan} -Medium	25 µg/ml	Kanamycin
SOB-Medium	2% (w/v)	Bacto Trypton
	0,5% (w/v)	Yeast Extract
Salzlösung (für die Elektroporation)	1 M	NaCl
	100 mM	MgCl ₂
	100 mM	MgSO ₄

5.1.3 Verwendete Organismen

BAKTERIEN STÄMME	BESCHREIBUNG
BacterioMatch®II Reporterstamm	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB - hsdSMR - mrr)173$ <i>endA1 hisB supE44 thi-1 recA1 gyrA96</i> <i>relA1 lac F'laq^r HIS3 aadA Kan^r</i> (Stratagene)
DH5a	<i>F'φ80ΔlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U196 ecA1</i> <i>endA1 hsdR17(r_K⁻ m_K⁺) phoA supE44 λ⁻ thi 1</i> <i>gyrA96 relA1 tonA</i> (confers resistance to phage T1) (Invitrogen)
SCS110	<i>rpsL</i> (Sm ^r) <i>thr leu endA thi-1 lacY galK galT</i> <i>ara tonA tsx dam dcm supE44D (lac-proAB)</i> <i>[F traD36 proAB lac^rZΔM15]</i> (Stratagene)
Top10F'	<i>F' [lac^r Tn10 (Tet^r)] mcrA Δ(mrr-hsdRMS-</i> <i>mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1</i> <i>araD139 Δ(ara-leu) 7697 galU galK rpsL</i> <i>endA1 nupG</i> (Invitrogen)
XL1-Blue MRF Kan	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB - hsdSMR - mrr) 173$ <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> <i>[F' proAB lac^rZ ΔM15 Tn5 (Kan^r)]</i> (Stratagene)

ZELLINIE	ZELLTYP	MEDIUM	REFERENZ
HEK-293T	humanes embryonales Nierenzellkarzinom	DMEM	ATCC CRL11268 (DuBridge <i>et al.</i> , 1987; Graham <i>et al.</i> , 1977)
HeLa	humanes Adenokarzinom	DMEM	ATCC CCL-2 (Scherer <i>et al.</i> , 1953)
SEM	humane lymphoblastische Leukämie-Zelllinie mit einer t(4;11) Translokation	UPMI	(Greil <i>et al.</i> , 1994)

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C, 95% relativer Luftfeuchte und 5 bzw. 7,5% CO₂ (HEK-293T und HeLa bzw. SEM Zellen). Die Nährmedien wurden jeweils mit 10% FCS (v/v), 1% L-Glutamin (v/v) sowie 1% Penicillin/Streptomycin (v/v) komplettiert.

5.1.4 Synthetische Oligonukleotide

Alle für die Klonierungen verwendeten Oligonukleotide wurden in Auftragssynthesen von den Firmen Biospring oder Operon hergestellt. Oligonukleotide, welche innerhalb der MLL Sequenz binden und zur Sequenzierungen verwendet wurden, wurden der bestehenden Datenbank entnommen und sind nicht gesondert aufgelistet. Sie wurden jeweils in der Art ausgewählt, dass die gesamten Amplifikate überprüft werden konnten. Erläuterung zur Bezeichnung: *3: Forward Primer; *5: reverse Primer

Oligonukleotide zur Einführung von neuen MCS

NAME	SEQUENZ
NDSF*3	5'- GGCCGCACATATGATATCGGCCATGGAGGCCAC -3'
NDSF*5	5'- TCGAGTGGCCTCCATGGCCGATATCATATGTGC -3'
XSfSSfCA-Linker*3	5'- TCGAGGGCCTCACTGGCCACTAGTGGCCAGTGAGGCCATCGATG -3'
XSfSSfCA-Linker*5	5'- GTACCATCGATGGCCTCACTGGCCACTAGTGGCCAGTGAGGCC -3'

Oligonukleotide für Klonierungen

Zur besseren Veranschaulichung sind die Sequenzen der zur Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen unterstrichen, komplementäre Sequenzen sind fett markiert und zusätzliche Nukleotide (zur Aufrechterhaltung des Leserahmens oder zur Einführung eine Start oder Stop-Codons) sind kursiv dargestellt.

Oligonukleotide für C-terminale MLL Fragmente

NAME	SEQUENZ
FYRC/SETneu*3	5'-CGAATTC <u>CGATCCCGGAAGGAAAGC</u> ATTACTGAG -3'
FYRC*5	5'-CGGAATTC <u>TGCCCTCCGAGCTGACTTCAGCTGTAC</u> -3'
FYRC/SET*5	5'-CGGAATTC <u>GTTTAGGAACTTCCGGCATTCTTGGC</u> -3'
FYRC/SET*3IV	5'-CGAATTCAGCGGCCGCACGGAAGGAAAGCATTACTGAG -3'
FYRCXho*5IV	5'-CGAATTC <u>TCGAGGTGCCCTCCGAGCTGACTTCAGCTGTAC</u> -3'
FYRC/SETXho*5IV	5'-CGAATTC <u>TCGAGGGTTTAGGAACTTCCGGCATTCTTGGC</u> -3'
FYRCnynh*3	5'-CGAATTCAGCGGCCGC <u>ACTGATGCTTTGGCTTCAGCAAGAAC</u> -3'
FYRCnynh*5	5'-CCGAATTC <u>TCGAGGCTTGTGAAA</u> CGGAATTTGTAATTTTCG -3'
FYRC1bNotBam*3	5'-CGGGATCCCGCGGCCGC <u>ACTCCATGATGCAGTTGTGTTCTC</u> -3'
FYRC2bNotBam*3	5'-CGGGATCCCGCGGCCGC <u>AACAGATAAAGTCCAGGAAGCTC</u> -3'
FYRC3bNotBam*3	5'-CGGGATCCCGCGGCCGC <u>AAAGAAAGGACTTGTTTTGAATTTTC</u> -3'
FYRC3bXhoSal*5	5'-CCGCTCGAGGTCGACCAATGACTTCCAGGCATCTTC -3'
FYRC2bXhoSal*5	5'-CCGCTCGAGGTCGACAATCCCCAGCATCCTCAAACCG -3'
FYRC2bXho*5	5'-CCGCTCGAG <u>AATCCCCAGCATCCTCAAACCG</u> -3'
FYRC2bNot*3	5'-CGAATTCAGCGGCCGCATGGCAACAGATAAAGTCCAGGAAGCTC -3'
FYRC2bXho*3	5'-CCGCTCGAGATGGCAACAGATAAAGTCCAGGAAGCTC -3'
FYRC1bAcc65I*5	5'-CCATGGTACCCTTGTGGAACGGAATTTGTAAT -3'

Oligonukleotide für N-terminale MLL Fragmente

NAME	SEQUENZ
MLL/N03*3	5'-CGAATTCATATGCTGAACCCACCCCCAGGCATAGAAGAC -3'
FYRN*5	5'-GGAATTCATATGCGCCAGGGGATCTCTGTGTTGGAGA -3'
N03*3IV	5'-CCATGGTACCATGGCACTGAACCCACCCCCAGGCATAGAAG -3'
FYRN*5IV	5'-CCATGGTACC <u>GCCAGGGGATCTCTGTGTTGGAGA</u> -3'
FYRNnynh*3	5'-CGAATTCAGCGGCCGCATGGCAGAGAATGGATTTGAAGTTTTCAGAAGAG -3'
FYRNnynh*5	5'-CCATGGTACC <u>ACTTATAATTCAGCTGTGTTTGAC</u> -3'
FYRN3aNotNde*3	5'-CGAATTCAGCGGCCGCATATGGCAATTGGATATCAGTGTTCAGG -3'
FYRN4aXhoAcc65I*5	5'-CCGCTCGAGGGTACC <u>ACTATGGGCAATGGTCTGTT</u> -3'
FYRN3aXhoAcc65I*5	5'-CCGCTCGAGGGTACCAGGCACTCCACTATCTTGC -3'
FYRN2aXhoAcc65I*5	5'-CCGCTCGAGGGTACCAAAGAGCTTATCTTCACAGTCG -3'
FYRN2aNot*3	5'-CGAATTCAGCGGCCGCATGGCAGAAAATATCCACATGATGATTGG -3'

FYRN1aNot*3	5'-CGAATTCAG <u>CGGCCGCA</u> AATGGCAGAGAATGGATTGAAGTTTCAGAAGAG-3'
FYRN1aAcc65I*5	5'-CCATGGT <u>ACCTT</u> CCAAGCCATTGAGAACTTCCT-3'

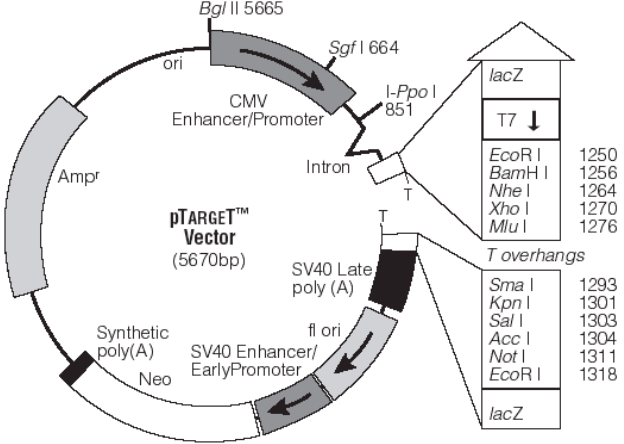
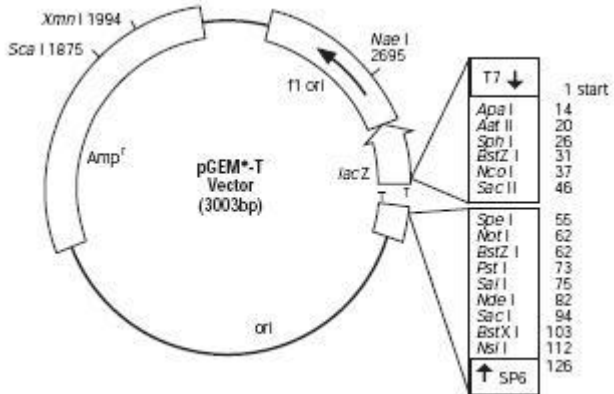
Oligonukleotide für Farbtags

NAME	SEQUENZ
BFP*3	5'-CGGGATCCTTGGT <u>ACCAT</u> GGCTAGCAAGGGCGAGGAG-3'
EGFP-mCherry*3	5'-CGGGATCCTTGGT <u>ACCAT</u> GGTGAGCAAGGGCGAGGAG-3'
EGFP-mCherry-BFP*5	5'-CCGCTCGAGT <u>GCGGCCGC</u> CTTGTACAGCTCGTCCATGC-3'
EGFP-mCherry/Dra*3	5'-CCG <u>TTTAAA</u> ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG-3'
EGFP-mCherry/Hpa*5	5'-CCG <u>GTTAAC</u> CTTGTACAGCTCGTCCATGC-3'

Sonstige Oligonukelotide

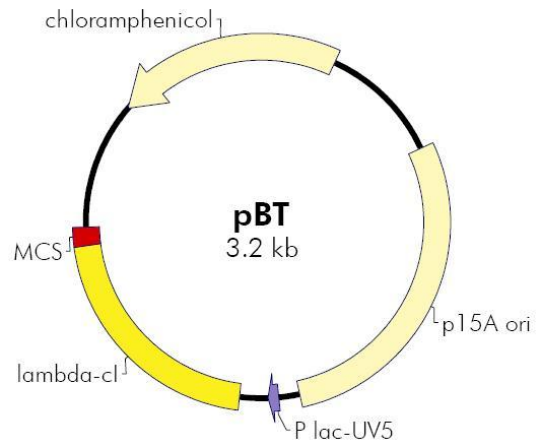
NAME	SEQUENZ
der4SbfI*FW	5'-AACCTGCAGG <u>GCAAGT</u> CGCTGTTCTTCGGAAGT-3'
der4ClaI*RW	5'-CCATCGATGTTTAGGA <u>ACTT</u> CCGGCATTCTTG-3'

5.1.5 Verwendete Plasmide

PLASMID	BESCHREIBUNG
pTARGET	<p>Eukaryontischer Expressionsvektor. Original Vektor der Firma Promega. Der in dieser Arbeit verwendete Vektor wurde zuvor in unserem Labor wie folgt modifiziert: Zirkularisierung des Vektors; Entfernung der im Vektor <i>backbone</i> enthaltenen <i>SfiI</i>-Schnittstelle.</p> 
pGEM-T	<p>Bakterieller Klonierungsvektor. Durch die vorhandenen T-Überhänge lassen sich mittels Taq-Polymerase amplifizierte DNA Fragmente direkt in diesen Vektor klonieren. Diente bei schwierigen Klonierungen als Zwischenvektor.</p> 

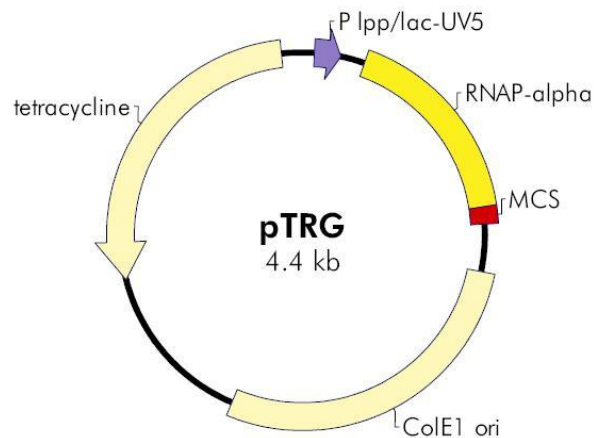
pBT

bait Vektor des B2H-Systems. Zur Identifikation von Proteininteraktionen im Reporterstamm in Kombination mit pTRG. Zur Verwendung wurde eine neue MCS eingefügt.



pTRG

target Vektor des B2H-Systems. Zur Identifikation von Proteininteraktionen im Reporterstamm in Kombination mit pBT.



pBT-LGF2

Kontroll-*bait*-Vektor des B2H-Systems

pTRG-Gal11p

Kontroll-*target*-Vektor des B2H-Systems

pc3-RevM10BL-BFP

bait Vektor des zellbasierten PTB-Systems. Amp^R, Neo^R, CMV Promotor, T7 Promotor, RevM10BL, BFP, bgh-polyA. (zur Verfügung gestellt von Dr. Shirley Knauer, GSH Frankfurt)

p3-NLS-GFP/GST-RevNES	<i>prey</i> Vektor des zellbasierten PTB-Systems. Amp ^R , Neo ^R , CMV Promotor, T7 Promotor, SV40NLS, GFP, GST, RevNES, bgh-polyA. (zur Verfügung gestellt von Dr. Shirley Knauer, GSH Frankfurt)
pRB-Set-mCherry	Bakterieller Expressionsvektor. Zur Amplifikation der <i>mCherry</i> cDNA. Amp ^R , T7 Promotor, His-tag. (TsienLab, University of California (CA, USA))

5.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.1 Standardmethoden

Die im Folgenden aufgelisteten Methoden wurden soweit nicht anders angegeben nach vorhandenen Standard-Protokollen (Sambrook *et al.*, 2001) oder nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

- Agarose Gelelektrophorese
- Auffüllreaktionen von überhängenden DNA-Enden (mit Klenow Large fragment)
- Aufreinigung von DNA durch Gelextraktion (Qiagen)
- Aufreinigung von PCR-Amplifikaten (Qiagen)
- Dephosphorylierung von 5' DNA-Enden mit alkalischer Phosphatase
- Elektroporation von *E. coli*
- Fällung von Nukleinsäuren
- Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* (Promega)
- Kinasierung von 5' DNA-Enden mit T4 Polynukleotid Kinase
- Ligation von DNA mit T4 DNA Ligase
- Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* mit der *boiled-lysis* Methode (Holmes and Quigley, 1981)
- Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* durch alkalische Lyse
- Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration
- Photometrische Bestimmung der Protein-Konzentration
- Protein-Induktionskinetik in *E. coli*
- Restriktion von DNA

- SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
- Transformation von *E. coli* durch Hitzeschock
- Western Blot

5.2.2 Sequenz-Analysen

DNA-Sequenzanalysen erfolgten unter Verwendung des *ABI Prism Big DyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* mit dem Kettenabbruchverfahren (Sanger *et al.*, 1977). Die Detektion basiert auf unterschiedlichen Fluoreszenzen und erfolgte im ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer.

Sequenzierungen wurden unter Verwendung des *ABI Prism Big DyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* durchgeführt.

Für DNA-Sequenzierungen wurde das *ABI Prism Big DyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* verwendet. Die DNA wird hierbei nach der Kettenabbruchmethode sequenziert, die Detektion basiert auf der Messung von unterschiedlicher Fluoreszenz. Es kann sowohl Einzelstrang- als auch Doppelstrang-DNA analysiert werden.

Standard-Ansatz für eine Sequenzierungsreaktion:

4 µl	DNA [≈ 100-250 ng/µl]
3 µl	Terminator Ready Reaction Mix
3 µl	Primer [2 pmol/µl]

Mit folgendem PCR-Programm wurde die gewünschte DNA amplifiziert:

94°C	10 min	} 25 Zyklen
56°C	10 min	
60°C	4 min	

5.2.3 Annealing zweier Oligonukleotide

Bietet die MCS eines Vektors für eine geplante Klonierung keine passenden Restriktionsschnittstellen, können diese über die Insertion eines spezifisch gewählten Polylinkers eingefügt werden. Je 50 µl der Arbeitsverdünnung zweier entsprechender komplementärer Oligonukleotide werden zusammengegeben und auf dem Heizblock auf 100°C erhitzt. Nach 4 minütiger Inkubation wird das Reaktionsgefäß auf

Raumtemperatur (RT) überführt. Ist die Lösung abgekühlt sind die beiden Oligonukleotide zum Polylinker verbunden und können über die integrierten Restriktionsschnittstellen-Überhänge in den linearisierten Vektor eingebracht werden.

5.3 Bakteriell-2-Hybrid-System

Für den Interaktionsnachweis von zwei potentiell interagierenden Proteinen wurde das bakterielle 2-Hybrid-System verwendet. Es basiert auf der Co-Transformation von zwei verschiedenen Vektoren, dem *prey* und dem *bait* Vektor, und einer Wachstumsanalyse auf entsprechenden Selektionsplatten.

Alle verwendeten Lösungen wurden sterilfiltriert bzw. autoklaviert.

LÖSUNG	ZUSAMMENSETZUNG	
10x Histidin Dropout (HisDO)	3,35g ad 500 ml	Histidin-Dropout AS Zusatz ddH ₂ O → 15 min autoklavieren
3-AT, 1M	841 mg 10 ml	3-Amino-1,2,4-Triazol DMSO
10x M9-Salze	5 g 37,5 g 15 g 25 g ad 500 ml	NH ₄ Cl Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O KH ₂ PO ₄ NaCl ddH ₂ O → autoklavieren
M9 Medium Additivum		
Lösung I	10 ml 5 ml 50 ml	Glucose 20% (steril filtriert) 20 mM Adenin (steril filtriert) 10x HisDO
Lösung II (steril filtrieren)	0,5 ml 0,5 ml 0,5 ml 0,5 ml 0,5 ml	1 M MgSO ₄ 1 M Thiamin-HCl 10 mM ZnSO ₄ 100 mM CaCl ₂ 50 mM IPTG
→ Lösung I und II gründlich mischen		
NÄHR- UND SELEKTIONSMEDIEN	ZUSAMMENSETZUNG	
M9 HisDO-Medium	50 ml 67,5 ml ad 500 ml	M9 Salze M9 Medium Additivum ddH ₂ O

Material und Methoden

M9 HisDO-Agar	7,5 g 380 ml	Bacto Agar ddH ₂ O → autoklavieren
	50 ml 67,5 ml 0,5 ml 1,25 ml	M9 Salze M9 Medium Additivum Chloramphenicol, CAM (25 mg/ml) Tetracyclin, Tet (5 mg/ml)
3-AT Selektionsagar (5 mM)	5 g/l	1M 3-AT M9 HisDO-Agar
Streptomycin Selektionsagar	0,6 ml 500 ml	Streptomycin (10 mg/ml) M9 HisDO-Agar
LB-Medium	10 g 10 g 5 g ad 1000 ml	Bacto Trypton NaCl Yeast extract ddH ₂ O
LB-Agar	12 g ad 1000 ml	Bacto Agar LB-Medium
LB-CAM ₃₄ -Selektionsagar	1000 ml 1,36 ml	LB-Agar CAM (25 mg/ml)
LB-CAM ₂₀ - Selektionsmedium	500 ml 400 µl	LB-Medium CAM (25 mg/ml)
LB-Tet _{12,5} - Selektionsagar	1000 ml 2,5 ml	LB-Agar Tet (5 mg/ml)
LB-Tet _{6,25} -Selektionsmedium	250 ml 0,313 ml	LB-Medium Tet (5 mg/ ml)

Die Identifikation bzw. Verifikation von Proteininteraktionen erfolgt beim *BacterioMatch*TM *Two Hybrid*-System (Stratagene) über die transkriptionelle Aktivierung bestimmter Reportergene infolge der Interaktion der überprüften Proteine. Es steht ein bakterieller Reporterstamm zur Verfügung, welcher über zwei unterschiedliche Reportergene verfügt. Das *aadA* Gen vermittelt bei Aktivierung eine Streptomycin-Resistenz, das *HIS3* Gen ermöglicht bakterielles Wachstum auf Histidin-Mangelmedium. Für die Aktivierung der beiden Reportergene ist eine Bindung des λ cl-Repressorprotein an die λ -Operator-Sequenz bei gleichzeitiger Bindung der RNA-Polymerase an den λ -Promotor notwendig. Diese beiden Proteine werden von den bakteriellen Plasmiden pBT und pTRG des Systems kodiert. Zur Durchführung von Interaktionsstudien werden die cDNAs der zu testenden Proteine in diese beiden Vektoren kloniert. Auf diese Weise kommt es zu einer zur Bildung eines Fusionsproteins aus DNA-Bindedomäne_ λ cl-Repressor-

protein_Dimerisierungsdomäne (vom System geliefert) und dem sogenannten *bait* Protein, und zum anderen zur Bildung eines Fusionsproteins aus der N-terminalen Domäne der α -Untereinheit der RNA-Polymerase (vom System geliefert) und dem sogenannten *target* Protein. Interagieren die Proteine *bait* und *target* miteinander, kommt es zur Expression der Reportergene, wodurch das Wachstum auf entsprechendem Selektionsmedium möglich wird. Neben den 2 Reporterplasmiden stellt das System 2 Kontrollplasmide zur Verfügung, welche für 2 interagierende Proteine kodieren (Dimerisierungsdomäne von Gal4 aus Hefe sowie Gal11^P, eine Mutante des Gal11-Proteins).

5.3.1 Klonierung und Verifikation der bakteriellen Plasmide

Bei allen Arbeiten mit den Plasmiden pBT und pTRG war zu beachten, dass es sich um *low copy* Plasmide handelt. Entsprechend wurden die verwendeten Volumina nach Plasmidpräparationen angepasst. Zur Erzeugung der Konstrukte für die Interaktionsanalysen wurden Vektor und Insert mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und nach Aufreinigung über ein Agarose-Gel im molaren Verhältnis von etwa 1:3 in einem Gesamtvolumen von maximal 20 μ l über Nacht bei 16°C ligiert. Für die nachfolgende Elektroporation wurden 2 μ l des Gesamtansatzes mit 50 μ l elektrokompetenten XL-1 *blue* MRF' Kan Bakterien zusammengegeben. Nach der Transformation (2,5 kV, 25 μ F, 200 Ω) wurden die Bakterien sofort in 1 ml SOB-Medium (+ 40% Glucose) und 30 μ l Salzlösung überführt und für 30 min bei 220 Upm im Schüttelinkubator inkubiert. Transformationsansätze mit dem pBT Plasmid wurden entsprechend dem vorhandenen Resistenzgen zum Wachstum der Bakterien auf LB-CAM₃₄-Agarplatten ausplattiert, während solche mit dem pTRG Plasmid auf LB-Tet_{12,5}-Agarplatten ausgebracht wurden. Die Selektionsplatten wurden zum Wachstum der Bakterien für zwei Tage im 30°C Inkubator belassen. Flüssigkulturen für nachfolgende Mini-DNA-Präparationen enthielten zur Selektion des pBT Plasmids 20 μ g/ml CAM, solche zur Selektion des pTRG Plasmids enthielten 6,5 μ g/ml Tet und wurden bei 30°C im Schüttelinkubator wachsen gelassen. Die Überprüfung der durch die Klonierung erhaltenen Plasmide erfolgte über Restriktionsverdau und Sequenzierung.

5.3.2 Co-Transformation und Interaktionsanalyse

Für die Interaktionsanalyse der Proteine mussten die erhaltenen Plasmide gleichzeitig mittels Co-Transformation in Bakterien des Reporterstamms eingebracht werden. Jeweils 20 ng jedes Plasmids wurden verwendet, um 50 μ l elektrokompetente XL-1 *blue* MRF' Kan Bakterien zu transformieren. Nach 30-minütiger Inkubation der Bakterien in

1 ml SOB-Medium bei 37°C in einem Schüttelinkubator wurden die Bakterien auf nichtselektiven (ohne 3-AT) M9-HisDO-Platten ausgebracht und für 24h im 37°C Inkubator belassen. Von jeder Co-Transformationsplatte wurden bis zu 10 Klone auf eine nichtselektive M9-HisDO Masterplatte überimpft. Die Klone der Masterplatten wurden schließlich auf selektive M9-HisDO Agarplatten ausgestrichen (mit 5mM 3-AT). Nach einer 24 stündigen Inkubation der Selektionsplatten bei 37°C wurde das Wachstum der Bakterien untersucht. Konnte bei einer Co-Transformation auf den Selektionsplatten Wachstum beobachtet werden, galt eine Interaktion der exprimierten Proteine als erwiesen. Nach dreimaliger Wiederholung jedes Versuchs wurden die positiven Interaktionen auf Streptomycin-Selektionsplatten (12 µg/ml) bestätigt. Für jedes untersuchte Proteinpaar wurden Negativkontrollen mit den passenden Leervektoren durchgeführt. Auf diese Weise konnten Eigenaktivierungen der klonierten Plasmide ausgeschlossen werden. Positivkontrollen in Form von Co-Transformation der Kontrollvektoren zeigten die generelle Gültigkeit des jeweiligen Versuchs an und wurden stets parallel durchgeführt.

5.4 Arbeiten mit Säugerzellen

5.4.1 *Transfektion von adhärenenten Säugerzellen mittels Lipofectamin*

Die Transfektion von Säugerzellen (HeLa) mit Lipofectamin 2000 Transfektionsreagenz von Invitrogen wurde in 6-Loch Zellkulturschalen durchgeführt. 24h vor der Transfektion wurden pro Vertiefung 4×10^5 Zellen ausgebracht. Vor der eigentlichen Transfektion wurden 5 µl des Lipofectamins für 5 min mit 250 µl Optimem-Medium in einem Eppendorfgefäß inkubiert. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurde unterdessen die DNA (2-4 µg, für jedes Plasmid bzw. jede Plasmid-Kombination wurde das optimale Lipofectamin:DNA Verhältnis separat bestimmt) ebenfalls mit 250 µl Optimem Medium vereint. Nach Ablauf der 5 Minuten wurde die DNA-Medium Lösung auf dem Vortexer zum Lipofectamin hinzu pipettiert. Zur Ausbildung der Präzipitate wurde der Transfektionsansatz für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Vor Zugabe der Transfektionsreaktion wurden die zu transfizierenden Zellen ein Mal gründlich mit äußerster Vorsicht mit sterilem 1x PBS gewaschen und mit 2 ml Optimem Medium versorgt. Der Transfektionsansatz wurde tröpfchenweise auf die Zellen verteilt. Da Lipofectamin auf Dauer den Zellen schadet, wurde 4h nach Zugabe das Medium gewechselt. Protein-Expressionen wurden frühestens 24h nach Transfektion untersucht.

5.4.2 Transfektion von adhärennten Säugerzellen mittels Polyethylenimin (PEI)

Herstellung der PEI-Stammlösung:

100 mM PEI (Monomer)	45 mg	PEI (MW = 25.000)
	ad 10 ml	ddH ₂ O (pH = 7, mit HCl)

→ steril filtrieren, bei 4°C lagern

Polyethylenimin ist ein kationisches Polymer, welches mit der negativ geladenen DNA Komplexe ausbildet und auf diese Weise zur Transfektion von Zellen eingesetzt wird. Die Transfektionseffizienz hängt vom optimalen Verhältnis der positiv geladenen N-Atome im PEI zu den negativ geladenen Phosphatresten der DNA ab. Unter der Annahme, dass 1 µg DNA 3 nmol Phosphat und 1 µl 10mM PEI (Arbeitsverdünnung) 10 nmol Stickstoff entspricht, wird ein Verhältnis von N/P zwischen 9 und 12 vorgeschlagen. Durchschnittlich erwies sich zur Transfektion von HeLa Zellen und HEK-293T Zellen ein Verhältnis von N/P von 12 als optimal.

In Vorbereitung der Transfektion wurde etwa 1h zuvor ein Mediumwechsel vorgenommen. Für die Transfektion in einer 10 cm Zellkulturschale (Aussaat von $2,5 \times 10^6$ Zellen 24h vor Transfektion) wurden 10 µg DNA sowie 36 µl 10mM PEI (Arbeitsverdünnung) mit je 180 µl 1x PBS versetzt. Während die PEI Lösung auf dem Vortexer geschüttelt wurde, wurde die DNA tröpfchenweise hinzu pipettiert. Zur Ausbildung der Komplexe wurde die Mischung 20 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde der gesamte Transfektionsansatz tröpfchenweise über die Zellen verteilt. Nach 24h konnten die transfizierten Zellen wie gewünscht weiter behandelt werden.

5.4.3 Transfektion von Suspensionszellen durch Nukleofektion

Zur Transfektion von Suspensionszellen wurde das Nucleofector-Kit R von Amaxa verwendet (Auswahl des Kits durch Kommunikation mit Labor Heidenreich, Newcastle upon Tyne, UK). Um eine möglichst effiziente Transfektion zu erreichen, müssen sich die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase befinden. Die verwendeten SEM Zellen wurden daher 2 Tage vor der Transfektion auf eine Dichte von 5×10^5 /ml Medium eingestellt. Um den Zellen im Anschluss an die Nukleofektion möglichst optimale Bedingungen zu schaffen, wurde pro Transfektion eine Vertiefung einer 12-Loch-Platte mit 1 ml Medium beschickt und im Brutschrank vorgewärmt. Pro Transfektionsreaktion wurden am Versuchstag 3×10^6 Zellen geerntet (10 minütige Zentrifugation bei $100 \times g$) und in 100 µl Nucleofector Solution resuspendiert. Da diese Lösung den Zellen bei verlängerter Exposition schadet (max. 15 min Inkubation), wurde jede Transfektion einzeln bearbeitet. Die Zellen wurden mit der gewünschten Menge DNA vereint (2 µg

des Kontrollplasmids, 4 µg der „eigenen“ Plasmide) und in eine von Amaxa bereitgestellte Elektroporationsküvette überführt (keine Luftblasen!). Die Küvette wurde in den Elektroporator eingespannt und die Zellen wurden mit 250 V für 10 ms gepulst. Um die Zellen bestmöglich zu schützen, wurden direkt im Anschluss 500 µl vorgewärmtes Medium zugegeben und der gesamte Ansatz mit einer sterilen Plastikkuvette (mitgeliefert) in eine mit Medium vorbereitete Vertiefung gegeben.

5.4.4 Herstellung von Gesamt-Zelllysate aus adhärenenten Zellen

Lysis-Puffer:	150 mM	NaCl
	20mM	HEPES pH 7,5
	1%	Triton X-100
	0,4 mM	EDTA

Dieser Lysis-Puffer wird kurz vor Gebrauch mit weiteren Zusatzstoffen komplettiert.

Lysis-Puffer komplett:	1 mM	Na ₃ VO ₄
	10 mM	NaF
	1 mM	PMSF (100-fach in Isopropanol)
	1x	Protease Inhibitor Cocktail Set V

Zur Herstellung von Gesamt-Zelllysate wurden die entsprechenden Zellen unter Verwendung von 1x Trypsin von der Zellkulturschale abgelöst und in einem 15 ml Falconröhrchen gesammelt. Um keine Zellen zu verlieren wurde die Platte mit 1x PBS gewaschen und dieses mit den ersten Zellen vereint. Nach Zentrifugation der Zellen wurde der Überstand gründlich abgesaugt und das Pellet in Lysis-Puffer resuspendiert. Es wurde eine minimale Menge Lysis-Puffer verwendet, um die Proteinkonzentration möglichst hoch zu halten. Für eine konfluente 15 cm Zellkulturschale wurden 100 µl Lysis-Puffer komplett verwendet ($7,5 \times 10^6$ Zellen wurden ausgesät, die Ernte erfolgt nach 48h). Die Zelllyse wurde für 1 Stunde bei 4°C auf dem Zellrotator (Stufe 7) durchgeführt. Im Anschluss wurde das Zelllysate bei 4°C für 30 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Entsprechend den geplanten Folgeversuchen wurde mit dem Überstand weitergearbeitet.

5.4.5 Co-Immunopräzipitation

Die Co-Immunopräzipitation wurde im direkten Anschluss an die Zelllyse durchgeführt. Der bei dieser Prozedur erhaltene Überstand wurde in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und zur Absättigung unspezifischer Bindestellen mit Protein G Agarose versetzt (20 µl pro konfluente 15 cm Zellkulturschale). Nach 30 minütiger Inkubation bei

4°C wurden die Agarose beads abzentrifugiert und der Überstand in ein Chromatographiesäulchen der Firma BioRad überführt. Die Inkubation des Zelllysats mit dem Antikörper (5-10 µl) erfolgte zunächst für eine Stunde bei RT und anschließend über Nacht bei 4°C auf dem Orbitalschüttler. Um die Protein-Antikörper Komplexe aus der Zellsuspension zu isolieren, wurde am nächsten Morgen 10 µl Protein G Agarose hinzugegeben und erneut für 3h bei 4°C rotiert. Durch Zentrifugation für 10 Sekunden bei 800 Upm in der Tischzentrifuge wurden die gebildeten Gesamt-Komplexe vom Überstand abgetrennt. Die Agarose-beads samt gebundenem Komplex wurden im Anschluss 5-mal mit 500 µl PBS-Puffer gewaschen, um unspezifisch adhärierte Proteine zu entfernen. Die Zentrifugation erfolgte erneut für 10 Sekunden bei 800 Upm. Die Waschfraktionen wurden separat aufgefangen und je ein Aliquot mit Laemmli-Probenpuffer versetzt. Durch Analyse dieser Proben kann abgesichert werden, dass die bei der folgenden Elution eluierten Proteine spezifische Bindungen eingegangen waren. Die Elution der gebundenen Proteinkomplexe erfolgte schließlich durch Zugabe von vorgewärmtem (80°C) 2x Laemmli-Puffer (ca. 50 µl, jedoch so wenig wie möglich) und 15 minütige Inkubation bei RT. Durch Zentrifugation für 20 Sekunden bei 800 Upm wurden die Agarose-beads abgetrennt.

5.4.6 Durchflusscytometrie zur Bestimmung der GFP⁺ und PI⁺ Zellen

Die Durchflusscytometrie bietet die Möglichkeit, in einer Zellsuspension verschieden fluoreszierende Zellen zu detektieren und zu zählen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen anhand der GFP Expression bzw. der PI Integration bewertet. Das Vorhandensein des GFP bedeutete die Anwesenheit eines MLL Proteinfragments, während über PI die toten Zellen identifiziert wurden. Die Auswertung erfolgte in der Art, dass der prozentuale Anteil GFP- und PI-positiver Zellen von allen GFP-positiven Zellen bestimmt wurde. Auf diese Weise kann eine Relation zwischen dem jeweilig vorhandenen Proteinfragment und dem Absterben der Zellen hergestellt werden. Die Bestimmung der alleinig PI-positiven Zellen kann zur endgültigen Bewertung der erhaltenen Ergebnisse herangezogen werden, da dieser Wert ungewöhnliche Sterberaten in der analysierten Zellpopulation anzeigt.

Für die Messungen im Durchflusscytometer wurden die Zellen durch Zentrifugation vom Medium befreit und in einer angemessenen Menge 1x PBS resuspendiert. Beispielsweise wurden HeLa Zellen aus einer Vertiefung einer 6-Loch-Platte in 500 µl 1x PBS aufgenommen. Die Dichte der Zellen in Suspension wirkt sich lediglich auf die Dauer der Messung aus, daher sind keine exakten Volumina nötig.

Bei der Messung werden die Zellen durch einen Laser angeregt, worauf hin verschiedene Parameter gemessen werden. Die Detektion des Streulichts im *Forward Scatter* FSC sowie im *Sideward Scatter* SSC geben Auskunft über Größe und Granularität der jeweiligen Zelle. Mithilfe dieser Werte können durch entsprechendes *Gating* (Auswahl einer bestimmten Teilmenge von Zellen in einem bestimmten Größen und Granularitätsbereich) Zelltrümmer etc. von der Messung ausgeschlossen werden. Neben dem Streulicht werden selbstverständlich die emittierten Fluoreszenzen gemessen. Da jede Zelllinie eine gewisse Eigenfluoreszenz besitzt, muss auch hier durch entsprechendes *Gating* sichergestellt werden, dass nur jene Zellen bewertet werden, welche tatsächlich fluoreszieren. Wurde der Durchflusscytometer für die jeweilige Zelllinie korrekt eingestellt, wurden die Messungen vorgenommen. Mit der zugehörigen Software lassen sich die Resultate in Form verschiedener Diagrammtypen und Tabellen darstellen.

5.4.7 Propidiumiodid Färbung

Die Propidiumiodid Färbung dient der spezifischen Markierung toter Zellen in einem Zellgemisch. Es gelangt durch die perforierte Zellmembran in die toten Zellen und interkaliert sequenzunspezifisch in die DNA. Die Fluoreszenzintensität des Farbstoffs wird durch die Bindung um das 20- bis 30-fache erhöht. Lebende Zellen können nicht angefärbt werden, da PI nicht durch die intakte Zellmembran in die Zellen gelangen kann.

Zur Färbung der Zellen werden diese wie gewohnt geerntet und in 1x PBS resuspendiert. Jede Probe wird mit 2 µl PI Lösung versetzt und im Anschluss im Durchflusscytometer analysiert.

5.4.8 Herstellung von Dauerpräparaten

Mittels Dauerpräparaten können fixierte Zellen für spätere Analysen haltbar gemacht werden. Für die Herstellung dieser Präparate werden mit Zellen bewachsene Deckgläser mithilfe eines Einbettmittels auf einen Objektträger aufgebracht und fixiert. Damit die Zellen auf den Deckgläsern wachsen können, müssen diese vor dem Ausbringen der Zellen in die Zellkulturschalen gelegt werden. Typischerweise wurden für die Versuche 6-Loch-Platten verwendet. Um eine bessere Haftung der Deckgläser an der Oberfläche zu erreichen, wurde in jede Vertiefung ein Tropfen steriles Glycerin ausgebracht. Jedes Deckglas wurde in 96%-igen Ethanol getaucht, anschließend über dem Brenner abgeflammt und erst dann in eine Vertiefung gelegt. Nach einer kurzen Trocknungszeit des Glycerins wurden die Zellen wie gewohnt ausgebracht und weiterbehandelt. In

dieser Arbeit wurden Dauerpräparate von doppelt-transfizierten Zellen angefertigt, um die Interaktion der exprimierten Proteine untersuchen zu können. Die Fixierung der Zellen erfolgte dementsprechend 24h nach Transfektion.

Fixierlösung	4%	Para-Formaldehyd in PBS
Waschlösung I	0,1%	Triton X100 in PBS
Waschlösung II	0,1% 0,1%	Triton X100 NaBH ₄ PBS
0,1% Triton X100	100 µl 100 ml	Triton X100 PBS
Einbettmittel	6 g 2,4 g 6 ml	Glycerin Mowiol H ₂ O

→ mindestens 2h bei RT mischen

12 ml 0,2 M Tris pH 8,5

→ bei 53°C ca. 30 min lösen, ungelöste Partikel durch Zentrifugation (5000 Upm, 20 min) entfernen

0,025 g DABCO

→ aliquotieren, Lagerung bei -20°C; einmal geöffnet kann ein Aliquot für 4 Wochen bei 4°C gelagert werden.

Vor der Fixierung wurde das Medium von den Zellen entfernt und diese ein Mal vorsichtig mit 1x PBS gewaschen. Die Fixierung selbst erfolgte durch Überschichtung der Zellen mit Fixierlösung und 10 minütiger Inkubation bei RT. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Lösung vorsichtig abgesaugt und die Zellen 5 min mit 1x PBS gespült. Zur vollständigen Entfernung verbliebener Fixierlösung folgten mehrere Waschschrte. Zuerst wurde für 5 min mit Waschpuffer I gewaschen, im Anschluss 5 min mit Waschpuffer II. Die letzten 3 Waschschrte erfolgten erneut mit Waschpuffer I ebenfalls für 5 min. Nach dem letzten Waschen wurde die Flüssigkeit gründlich abgesaugt und das Deckglas mithilfe einer sterilen Pipette vorsichtig entnommen. Die Restflüssigkeit wurde durch vorsichtiges abtupfen entfernt. Auf einen Objektträger wurde 15 µl Einbettlösung gegeben und das Deckglas zellabwärts aufgelegt. Durch vorsichtiges Festdrücken wurden entstandene Luftblasen entfernt. Der Objektträger wurde nun für 2h bei RT im Dunklen belassen, bevor er zum völligen Aushärten des Mowiol über Nacht bei 4°C gelagert wurde. Überschüssiges Mowiol konnte am nächsten Morgen mit Wasser abgespült werden.

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%(v/v)	Volumenprozent
%(w/v)	Gewichts/Massenprozent
3-AT	3-Amino-1,2,4-Triazol
°C	Grad Celcius
AF4	ALL-1 Fused gene from chromosome 4
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
ALF	AF4, LAF4, FMR2
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APOD	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Aminosäure(n)
B2H	Bacterial Two Hybrid
bcr	breakpoint cluster region
BFP	Blue Fluorescent Protein
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
CAM	Chloramphenicol
CBP	CREB-Binding Protein
CD	Cluster of Differentiation
CDK	Cyclin Dependent Kinase
cDNA	complementary DNA
CHD	C-terminale Homologie-Domäne
C-IAD	C-terminale Interaktionsdomäne
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CLP	Common Lymphoid Progenitor

CML	Chronische myeloische Leukämie
CMP	Common Myeloid Progenitor
CREB	Cyclic AMP Response Element-Binding Protein
CS	Cleavage Site
CTD	C-terminale Domäne
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
dd	doppelt destilliert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleicacid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSB	Doppelstrangbruch
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFS	Event Free Survival
FAB	French American British cooperative group
FCS	Fetal Calf Serum
FEL	Four Eleven Leukemia
FSC	Forward Scatter
FYRC	Phenylalanin Tyrosin reiche Region in MLL_C
FYRN	Phenylalanin Tyrosin reiche Region in MLL_N
g	Gramm/Erdbeschleunigung
GFP	Green Fluorescent Protein
GMP	Granulocyte Monocyte Precursor
GST	Glutathion S-Transferase
h	Stunde
HCF	Host Cell Factor

HDAC	Histon-Deacetylase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hi-Di™-Formamid	Highly deionized Formamid
HLA	Humanes Leukocyten Antigen
HSC	Hematopoietic Stem Cell
IgH	Immunglobulin Heavy chain
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactopyranosid
Kan ^R	Kanamycin-Resistenz
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Lysogeny Broth
LDI	Long-Distance Inverse PCR
M	Molar
MCS	Multiple Cloning Site
MDa	Megadalton
MEP	Megakaryocyte Erythrocyte Precursor
MEN-1	Multiple Endocrine Neoplasia type-1
mg	Milligramm
min	Minute(n)
miRNA	micro RNA
ml	Milliliter
MLL	Mixed Lineage/Myeloid Lymphoid Leukemia
mM	Millimolar
MRD	Minimal residual disease
ms	Millisekunde
MT-Domäne	Methyltransferase-Homologie-Domäne

MW	Molecular Weight
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
NHD	N-terminale Homologie-Domäne
NHEJ	Non Homologous End Joining
N-IAD	N-terminale Interaktionsdomäne
Neo ^R	Neomycin-Resistenz
NES	Nukleäres Exportsignal
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
ORF	Open Reading Frame
PAGE	Poly-Acrylamid Gel-Elektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEI	Polyethylenimin
PHD	Plant Homeo Domain
PI	Propidiumiodid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pmol	Picomol
PTB	Protein-Translokation-Biosensor
P-TEFb	Positive Transcription Elongation Factor b
RFP	Red Fluorescent Protein
RNA	Ribonucleicacid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
Upm	Umdrehungen pro Minute

RT	Raumtemperatur
SAR	Scaffold Attachment Region
SDS	Natrium (Sodium)-Dodecylsulfat
SET	Suppressor of variegation, Enhancer of zeste, Trithorax
siRNA	small interfering RNA
SNL	Speckled Nuclear Localization
SSC	Sideward Scatter
TAD	Transaktivierungsdomäne
t-ALL	Therapie-induzierte ALL
t-AML	Therapie-induzierte AML
TCR	T-Cell Receptor
TEMED	N, N, N', N',- Tetramethylethyldiamin
Tet ^R	Tetracyclin-Resistenz
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
YAC	Yeast Artificial Chromosom

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Aplan PD, Chervinsky DS, Stanulla M, Burhans WC (1996). Site-specific DNA cleavage within the MLL breakpoint cluster region induced by topoisomerase II inhibitors. *Blood* **87**: 2649--2658.
- Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, Pieters R, den Boer ML, Minden MD *et al* (2002). MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet* **30**: 41--47.
- Ayton PM, Cleary ML (2003). Transformation of myeloid progenitors by MLL oncoproteins is dependent on Hoxa7 and Hoxa9. *Genes Dev* **17**: 2298--2307.
- Batzler WU, Bertz J, K.Giersiepen, Haberland J, Hentschel S, Husmann G *et al.* (2008).
- Behm FG, Raimondi SC, Frestedt JL, Liu Q, Crist WM, Downing JR *et al* (1996). Rearrangement of the MLL gene confers a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia, regardless of presenting age. *Blood* **87**: 2870--2877.
- Benedikt A, Baltruschat S, Bursen A, Arrey TN, Meyer B, Karas M *et al* (2009). The human AF4 and the AF4•MLL multiprotein complexes provide functions in transcriptional and epigenetic processes. Manuskript eingereicht. *Mol Cell* **eingereicht**.
- Birke M, Schreiner S, García-Cuéllar M-P, Mahr K, Titgemeyer F, Slany RK (2002). The MT domain of the proto-oncoprotein MLL binds to CpG-containing DNA and discriminates against methylation. *Nucleic Acids Res* **30**: 958--965.
- Bitoun E, Oliver PL, Davies KE (2007). The mixed-lineage leukemia fusion partner AF4 stimulates RNA polymerase II transcriptional elongation and mediates coordinated chromatin remodeling. *Hum Mol Genet* **16**: 92--106.
- Borkhardt A, Wuchter C, Viehmann S, Pils S, Teigler-Schlegel A, Stanulla M *et al* (2002). Infant acute lymphoblastic leukemia - combined cytogenetic, immunophenotypical and molecular analysis of 77 cases. *Leukemia* **16**: 1685--1690.
- Broeker PL, Super HG, Thirman MJ, Pomykala H, Yonebayashi Y, Tanabe S *et al* (1996). Distribution of 11q23 breakpoints within the MLL breakpoint cluster region in de novo acute leukemia and in treatment-related acute myeloid leukemia: correlation with scaffold attachment regions and topoisomerase II consensus binding sites. *Blood* **87**: 1912--1922.
- Bursen A, Moritz S, Gaussmann A, Moritz S, Dingermann T, Marschalek R (2004). Interaction of AF4 wild-type and AF4.MLL fusion protein with SIAH proteins: indication for t(4;11) pathobiology? *Oncogene* **23**: 6237--6249.
- Bursen A, Schwabe K, Rüster B, Henschler R, Ruthardt M, Dingermann T *et al* (2009). Expression of the AF4-MLL fusion protein is necessary and sufficient for the development of acute leukemia in mice. *Cancer Cell* **eingereicht**.

- Butler LH, Slany R, Cui X, Cleary ML, Mason DY (1997). The HRX proto-oncogene product is widely expressed in human tissues and localizes to nuclear structures. *Blood* **89**: 3361--3370.
- Caslini C, Serna A, Rossi V, Introna M, Biondi A (2004). Modulation of cell cycle by graded expression of MLL-AF4 fusion oncoprotein. *Leukemia* **18**: 1064--1071.
- Caslini C, Yang Z, El-Osta M, Milne TA, Slany RK, Hess JL (2007). Interaction of MLL amino terminal sequences with menin is required for transformation. *Cancer Res* **67**: 7275--7283.
- Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S *et al* (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* **113**: 643--655.
- Chandrasekharappa SC, Guru SC, Manickam P, Olufemi SE, Collins FS, Emmert-Buck MR *et al* (1997). Positional cloning of the gene for multiple endocrine neoplasia-type 1. *Science* **276**: 404--407.
- Chen CS, Hilden JM, Frestedt J, Domer PH, Moore R, Korsmeyer SJ *et al* (1993a). The chromosome 4q21 gene (AF-4/FEL) is widely expressed in normal tissues and shows breakpoint diversity in t(4;11)(q21;q23) acute leukemia. *Blood* **82**: 1080--1085.
- Chen CS, Sorensen PH, Domer PH, Reaman GH, Korsmeyer SJ, Heerema NA *et al* (1993b). Molecular rearrangements on chromosome 11q23 predominate in infant acute lymphoblastic leukemia and are associated with specific biologic variables and poor outcome. *Blood* **81**: 2386--2393.
- Chen J, Santillan DA, Koonce M, Wei W, Luo R, Thirman MJ *et al* (2008). Loss of MLL PHD finger 3 is necessary for MLL-ENL-induced hematopoietic stem cell immortalization. *Cancer Res* **68**: 6199-207.
- Chen W, Li Q, Hudson WA, Kumar A, Kirchhof N, Kersey JH (2006). A murine Mll-AF4 knock-in model results in lymphoid and myeloid deregulation and hematologic malignancy. *Blood* **108**: 669--677.
- Cimino G, Moir DT, Canaani O, Williams K, Crist WM, Katzav S *et al* (1991). Cloning of ALL-1, the locus involved in leukemias with the t(4;11)(q21;q23), t(9;11)(p22;q23), and t(11;19)(q23;p13) chromosome translocations. *Cancer Res* **51**: 6712--6714.
- Cimino G, Rapanotti MC, Biondi A, Elia L, Coco FL, Price C *et al* (1997). Infant acute leukemias show the same biased distribution of ALL1 gene breaks as topoisomerase II related secondary acute leukemias. *Cancer Res* **57**: 2879--2883.
- Corral J, Lavenir I, Impey H, Warren AJ, Forster A, Larson TA *et al* (1996). An Mll-AF9 fusion gene made by homologous recombination causes acute leukemia in chimeric mice: a method to create fusion oncogenes. *Cell* **85**: 853--861.
- Dalla-Favera R, Bregni M, Erikson J, Patterson D, Gallo RC, Croce CM (1982). Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**: 7824--7827.

- Daser A, Rabbitts TH (2005). The versatile mixed lineage leukaemia gene MLL and its many associations in leukaemogenesis. *Semin Cancer Biol* **15**: 175--188.
- den Berghe HV, David G, Orshoven AB-V, Louwagie A, Verwilghen R, Daele MC-V *et al* (1979). A new chromosome anomaly in acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Hum Genet* **46**: 173--180.
- der Poel SZ-v, McCabe NR, Gill HJ, Espinosa R, Patel Y, Harden A *et al* (1991). Identification of a gene, MLL, that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 10735--10739.
- Derossi D, Joliot AH, Chassaing G, Prochiantz A (1994). The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem* **269**: 10444--10450.
- Dhalluin C, Carlson JE, Zeng L, He C, Aggarwal AK, Zhou MM (1999). Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* **399**: 491--496.
- DiMartino JF, Ayton PM, Chen EH, Naftzger CC, Young BD, Cleary ML (2002). The AF10 leucine zipper is required for leukemic transformation of myeloid progenitors by MLL-AF10. *Blood* **99**: 3780--3785.
- DiMartino JF, Cleary ML (1999). Mll rearrangements in haematological malignancies: lessons from clinical and biological studies. *Br J Haematol* **106**: 614--626.
- Djabali M, Selleri L, Parry P, Bower M, Young BD, Evans GA (1992). A trithorax-like gene is interrupted by chromosome 11q23 translocations in acute leukaemias. *Nat Genet* **2**: 113--118.
- Dobson CL, Warren AJ, Pannell R, Forster A, Rabbitts TH (2000). Tumorigenesis in mice with a fusion of the leukaemia oncogene Mll and the bacterial lacZ gene. *EMBO J* **19**: 843--851.
- Domer PH, Fakharzadeh SS, Chen CS, Jockel J, Johansen L, Silverman GA *et al* (1993). Acute mixed-lineage leukemia t(4;11)(q21;q23) generates an MLL-AF4 fusion product. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 7884--7888.
- Dou Y, Milne TA, Ruthenburg AJ, Lee S, Lee JW, Verdine GL *et al* (2006). Regulation of MLL1 H3K4 methyltransferase activity by its core components. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 713--719.
- Dou Y, Milne TA, Tackett AJ, Smith ER, Fukuda A, Wysocka J *et al* (2005). Physical association and coordinate function of the H3 K4 methyltransferase MLL1 and the H4 K16 acetyltransferase MOF. *Cell* **121**: 873--885.
- Dove SL, Joung JK, Hochschild A (1997). Activation of prokaryotic transcription through arbitrary protein-protein contacts. *Nature* **386**: 627--630.
- DuBridge RB, Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH, Calos MP (1987). Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* **7**: 379-87.

- Erfurth F, Hemenway CS, de Erkenez AC, Domer PH (2004). MLL fusion partners AF4 and AF9 interact at subnuclear foci. *Leukemia* **18**: 92--102.
- Ernst P, Fisher JK, Avery W, Wade S, Foy D, Korsmeyer SJ (2004). Definitive hematopoiesis requires the mixed-lineage leukemia gene. *Dev Cell* **6**: 437--443.
- Ernst P, Wang J, Huang M, Goodman RH, Korsmeyer SJ (2001). MLL and CREB bind cooperatively to the nuclear coactivator CREB-binding protein. *Mol Cell Biol* **21**: 2249--2258.
- Estable MC, Naghavi MH, Kato H, Xiao H, Qin J, Vahlne A *et al* (2002). MCEF, the newest member of the AF4 family of transcription factors involved in leukemia, is a positive transcription elongation factor-b-associated protein. *J Biomed Sci* **9**: 234--245.
- Fair K, Anderson M, Bulanov E, Mi H, Tropschug M, Diaz MO (2001). Protein interactions of the MLL PHD fingers modulate MLL target gene regulation in human cells. *Mol Cell Biol* **21**: 3589--3597.
- Felix CA, Hosler MR, Slater DJ, Megonigal MD, Lovett BD, Williams TM *et al* (1999). Duplicated regions of AF-4 intron 4 at t(4;11) translocation breakpoints. *Mol Diagn* **4**: 269--283.
- Felix CA, Lange BJ, Hosler MR, Fertala J, Bjornsti MA (1995). Chromosome band 11q23 translocation breakpoints are DNA topoisomerase II cleavage sites. *Cancer Res* **55**: 4287--4292.
- Ferrando AA, Armstrong SA, Neuberg DS, Sallan SE, Silverman LB, Korsmeyer SJ *et al* (2003). Gene expression signatures in MLL-rearranged T-lineage and B-precursor acute leukemias: dominance of HOX dysregulation. *Blood* **102**: 262--268.
- Finger LR, Harvey RC, Moore RC, Showe LC, Croce CM (1986). A common mechanism of chromosomal translocation in T- and B-cell neoplasia. *Science* **234**: 982-985.
- Ford AM, Ridge SA, Cabrera ME, Mahmoud H, Steel CM, Chan LC *et al* (1993). In utero rearrangements in the trithorax-related oncogene in infant leukaemias. *Nature* **363**: 358--360.
- Freiman RN, Herr W (1997). Viral mimicry: common mode of association with HCF by VP16 and the cellular protein LZIP. *Genes Dev* **11**: 3122--3127.
- Frestedt JL, Hilden JM, Moore RO, Kersey JH (1996). Differential expression of AF4/FEL mRNA in human tissues. *Genet Anal* **12**: 147--149.
- Gaussmann A, Wenger T, Eberle I, Bursen A, Bracharz S, Herr I *et al* (2007). Combined effects of the two reciprocal t(4;11) fusion proteins MLL.AF4 and AF4.MLL confer resistance to apoptosis, cell cycling capacity and growth transformation. *Oncogene* **26**: 3352--3363.
- Gillert E, Leis T, Repp R, Reichel M, Hösch A, Breitenlohner I *et al* (1999). A DNA damage repair mechanism is involved in the origin of chromosomal translocations t(4;11) in primary leukemic cells. *Oncogene* **18**: 4663--4671.

- Gozani O, Karuman P, Jones DR, Ivanov D, Cha J, Lugovskoy AA *et al* (2003). The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. *Cell* **114**: 99--111.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**: 59-74.
- Greil J, Gramatzki M, Burger R, Marschalek R, Peltner M, Trautmann U *et al* (1994). The acute lymphoblastic leukaemia cell line SEM with t(4;11) chromosomal rearrangement is biphenotypic and responsive to interleukin-7. *Br J Haematol* **86**: 275-83.
- Gu Y, Alder H, Nakamura T, Schichman SA, Prasad R, Canaani O *et al* (1994). Sequence analysis of the breakpoint cluster region in the ALL-1 gene involved in acute leukemia. *Cancer Res* **54**: 2327--2330.
- Gu Y, Nakamura T, Alder H, Prasad R, Canaani O, Cimino G *et al* (1992). The t(4;11) chromosome translocation of human acute leukemias fuses the ALL-1 gene, related to Drosophila trithorax, to the AF-4 gene. *Cell* **71**: 701--708.
- Gu Y, Shen Y, Gibbs RA, Nelson DL (1996). Identification of FMR2, a novel gene associated with the FRAXE CCG repeat and CpG island. *Nat Genet* **13**: 109--113.
- Han Z, Guo L, Wang H, Shen Y, Deng XW, Chai J (2006). Structural basis for the specific recognition of methylated histone H3 lysine 4 by the WD-40 protein WDR5. *Mol Cell* **22**: 137--144.
- Hanson RD, Hess JL, Yu BD, Ernst P, van Lohuizen M, Berns A *et al* (1999). Mammalian Trithorax and polycomb-group homologues are antagonistic regulators of homeotic development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 14372--14377.
- Heerema NA, Sather HN, Ge J, Arthur DC, Hilden JM, Trigg ME *et al* (1999). Cytogenetic studies of infant acute lymphoblastic leukemia: poor prognosis of infants with t(4;11) - a report of the Children's Cancer Group. *Leukemia* **13**: 679--686.
- Hensel JP, Gillert E, Fey GH, Marschalek R (2001). Breakpoints of t(4;11) translocations in the human MLL and AF4 genes in ALL patients are preferentially clustered outside of high-affinity matrix attachment regions. *J Cell Biochem* **82**: 299--309.
- Hess JL, Yu BD, Li B, Hanson R, Korsmeyer SJ (1997). Defects in yolk sac hematopoiesis in Mll-null embryos. *Blood* **90**: 1799--1806.
- Hoffbrand AV, Moss PAH, Pettit JE (2006). *Essential haematology*, 5th ed. edn. Blackwell Publishing Ltd.
- Holmes DS, Quigley M (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* **114**: 193--197.
- House CM, Frew IJ, Huang H-L, Wiche G, Traficante N, Nice E *et al* (2003). A binding motif for Siah ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 3101--3106.
- Hsieh JJD, Cheng EHY, Korsmeyer SJ (2003a). Taspase1: a threonine aspartase required for cleavage of MLL and proper HOX gene expression. *Cell* **115**: 293--303.

- Hsieh JJD, Ernst P, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Korsmeyer SJ (2003b). Proteolytic cleavage of MLL generates a complex of N- and C-terminal fragments that confers protein stability and subnuclear localization. *Mol Cell Biol* **23**: 186--194.
- Hughes CM, Rozenblatt-Rosen O, Milne TA, Copeland TD, Levine SS, Lee JC *et al* (2004). Menin associates with a trithorax family histone methyltransferase complex and with the *hoxc8* locus. *Mol Cell* **13**: 587--597.
- Huret JL (1997a). t(9;22)(q34;q11) in ALL. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*.
- Huret JL (1997b). t(9;22)(q34;q11) in ANLL. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*.
- Huret JL (1997c). t(9;22)(q34;q11) in CML. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*.
- Isaacs AM, Oliver PL, Jones EL, Jeans A, Potter A, Hovik BH *et al* (2003). A mutation in *Af4* is predicted to cause cerebellar ataxia and cataracts in the robotic mouse. *J Neurosci* **23**: 1631--1637.
- Isnard P, Coré N, Naquet P, Djabali M (2000). Altered lymphoid development in mice deficient for the *mAF4* proto-oncogene. *Blood* **96**: 705--710.
- Jeanmougin F, Wurtz JM, Douarin BL, Chambon P, Losson R (1997). The bromodomain revisited. *Trends Biochem Sci* **22**: 151--153.
- Johansson B, Moorman AV, Haas OA, Watmore AE, Cheung KL, Swanton S *et al* (1998). Hematologic malignancies with t(4;11)(q21;q23)--a cytogenetic, morphologic, immunophenotypic and clinical study of 183 cases. European 11q23 Workshop participants. *Leukemia* **12**: 779--787.
- Jones RS, Gelbart WM (1993). The *Drosophila* Polycomb-group gene Enhancer of zeste contains a region with sequence similarity to trithorax. *Mol Cell Biol* **13**: 6357--6366.
- Joung JK, Ramm EI, Pabo CO (2000). A bacterial two-hybrid selection system for studying protein-DNA and protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 7382--7387.
- Kersey JH, Wang D, Oberto M (1998). Resistance of t(4;11) (MLL-AF4 fusion gene) leukemias to stress-induced cell death: possible mechanism for extensive extramedullary accumulation of cells and poor prognosis. *Leukemia* **12**: 1561--1564.
- Klein G (2000). Dysregulation of lymphocyte proliferation by chromosomal translocations and sequential genetic changes. *Bioessays* **22**: 414--422.
- Knauer SK, Stauber RH (2005). Development of an autofluorescent translocation biosensor system to investigate protein-protein interactions in living cells. *Anal Chem* **77**: 4815--4820.
- Kowarz E, Burmeister T, Nigro LL, Jansen MWJC, Delabesse E, Klingebiel T *et al* (2007). Complex MLL rearrangements in t(4;11) leukemia patients with absent AF4.MLL fusion allele. *Leukemia* **21**: 1232--1238.

- Krivtsov AV, Feng Z, Lemieux ME, Faber J, Vempati S, Sinha AU *et al* (2008). H3K79 methylation profiles define murine and human MLL-AF4 leukemias. *Cancer Cell* **14**: 355-68.
- Lavau C, Du C, Thirman M, Zeleznik-Le N (2000a). Chromatin-related properties of CBP fused to MLL generate a myelodysplastic-like syndrome that evolves into myeloid leukemia. *EMBO J* **19**: 4655--4664.
- Lavau C, Luo RT, Du C, Thirman MJ (2000b). Retrovirus-mediated gene transfer of MLL-ELL transforms primary myeloid progenitors and causes acute myeloid leukemias in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 10984--10989.
- Lavau C, Szilvassy SJ, Slany R, Cleary ML (1997). Immortalization and leukemic transformation of a myelomonocytic precursor by retrovirally transduced HRX-ENL. *EMBO J* **16**: 4226--4237.
- Look AT (1997). Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* **278**: 1059--1064.
- Luo RT, Lavau C, Du C, Simone F, Polak PE, Kawamata S *et al* (2001). The elongation domain of ELL is dispensable but its ELL-associated factor 1 interaction domain is essential for MLL-ELL-induced leukemogenesis. *Mol Cell Biol* **21**: 5678--5687.
- Ma C, Staudt LM (1996). LAF-4 encodes a lymphoid nuclear protein with transactivation potential that is homologous to AF-4, the gene fused to MLL in t(4;11) leukemias. *Blood* **87**: 734--745.
- Ma Q, Alder H, Nelson KK, Chatterjee D, Gu Y, Nakamura T *et al* (1993). Analysis of the murine All-1 gene reveals conserved domains with human ALL-1 and identifies a motif shared with DNA methyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 6350--6354.
- Marschalek R, Nilson I, Löchner K, Greim R, Siegler G, Greil J *et al* (1997). The structure of the human ALL-1/MLL/HRX gene. *Leuk Lymphoma* **27**: 417--428.
- Martin ME, Milne TA, Bloyer S, Galoian K, Shen W, Gibbs D *et al* (2003). Dimerization of MLL fusion proteins immortalizes hematopoietic cells. *Cancer Cell* **4**: 197--207.
- Mazo AM, Huang DH, Mozer BA, Dawid IB (1990). The trithorax gene, a trans-acting regulator of the bithorax complex in *Drosophila*, encodes a protein with zinc-binding domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 2112--2116.
- Metzler M, Forster A, Pannell R, Arends MJ, Daser A, Lobato MN *et al* (2006). A conditional model of MLL-AF4 B-cell tumourigenesis using inverter technology. *Oncogene* **25**: 3093--3103.
- Meyer C, Kowarz E, Hofmann J, Renneville A, Zuna J, Trka J *et al* (2009). New insights into the MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia* **in press**.
- Meyer C, Kowarz E, Schneider B, Oehm C, Klingebiel T, Dingermann T *et al* (2006a). Genomic DNA of leukemic patients: target for clinical diagnosis of MLL rearrangements. *Biotechnol J* **1**: 656--663.

- Meyer C, Schneider B, Jakob S, Strehl S, Attarbaschi A, Schnittger S *et al* (2006b). The MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia* **20**: 777--784.
- Meyer C, Schneider B, Reichel M, Angermueller S, Strehl S, Schnittger S *et al* (2005). Diagnostic tool for the identification of MLL rearrangements including unknown partner genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 449--454.
- Milne TA, Briggs SD, Brock HW, Martin ME, Gibbs D, Allis CD *et al* (2002). MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Mol Cell* **10**: 1107--1117.
- Milne TA, Dou Y, Martin ME, Brock HW, Roeder RG, Hess JL (2005a). MLL associates specifically with a subset of transcriptionally active target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 14765--14770.
- Milne TA, Hughes CM, Lloyd R, Yang Z, Rozenblatt-Rosen O, Dou Y *et al* (2005b). Menin and MLL cooperatively regulate expression of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 749--754.
- Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K *et al* (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* **113**: 631--642.
- Mitterbauer-Hohendanner G, Mannhalter C (2004). The biological and clinical significance of MLL abnormalities in haematological malignancies. *Eur J Clin Invest* **34 Suppl 2**: 12--24.
- Morrissey J, Tkachuk DC, Milatovich A, Francke U, Link M, Cleary ML (1993). A serine/proline-rich protein is fused to HRX in t(4;11) acute leukemias. *Blood* **81**: 1124--1131.
- Morrissey JJ, Raney S, Cleary ML (1997). The FEL (AF-4) protein donates transcriptional activation sequences to Hrx-Fel fusion proteins in leukemias containing T(4;11)(Q21;Q23) chromosomal translocations. *Leuk Res* **21**: 911--917.
- Muntean AG, Giannola D, Udager AM, Hess JL (2008). The PHD fingers of MLL block MLL fusion protein-mediated transformation. *Blood* **112**: 4690-3.
- Nakamura T, Alder H, Gu Y, Prasad R, Canaani O, Kamada N *et al* (1993). Genes on chromosomes 4, 9, and 19 involved in 11q23 abnormalities in acute leukemia share sequence homology and/or common motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 4631--4635.
- Nakamura T, Canaani E, Croce CM (2007). Oncogenic All1 fusion proteins target Drosha-mediated microRNA processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 10980--10985.
- Nakamura T, Mori T, Tada S, Krajewski W, Rozovskaia T, Wassell R *et al* (2002). ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation. *Mol Cell* **10**: 1119--1128.
- Nakanishi H, Nakamura T, Canaani E, Croce CM (2007). ALL1 fusion proteins induce deregulation of EphA7 and ERK phosphorylation in human acute leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 14442--14447.

- Nilson I, Löchner K, Siegler G, Greil J, Beck JD, Fey GH *et al* (1996). Exon/intron structure of the human ALL-1 (MLL) gene involved in translocations to chromosomal region 11q23 and acute leukaemias. *Br J Haematol* **93**: 966--972.
- Nilson I, Reichel M, Ennas MG, Greim R, Knörr C, Siegler G *et al* (1997). Exon/intron structure of the human AF-4 gene, a member of the AF-4/LAF-4/FMR-2 gene family coding for a nuclear protein with structural alterations in acute leukaemia. *Br J Haematol* **98**: 157--169.
- Novell P, Hungerford D (1960). A minute chromosome in human granulocytic leukemia. *Science* **132**: 1497.
- Oliver PL, Bitoun E, Clark J, Jones EL, Davies KE (2004). Mediation of Af4 protein function in the cerebellum by Siah proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 14901--14906.
- Pedersen-Bjergaard J, Philip P (1991). Balanced translocations involving chromosome bands 11q23 and 21q22 are highly characteristic of myelodysplasia and leukemia following therapy with cytostatic agents targeting at DNA-topoisomerase II. *Blood* **78**: 1147--1148.
- Pedersen-Bjergaard J, Rowley JD (1994). The balanced and the unbalanced chromosome aberrations of acute myeloid leukemia may develop in different ways and may contribute differently to malignant transformation. *Blood* **83**: 2780--2786.
- Pineault N, Helgason CD, Lawrence HJ, Humphries RK (2002). Differential expression of Hox, Meis1, and Pbx1 genes in primitive cells throughout murine hematopoietic ontogeny. *Exp Hematol* **30**: 49--57.
- Prasad R, Yano T, Sorio C, Nakamura T, Rallapalli R, Gu Y *et al* (1995). Domains with transcriptional regulatory activity within the ALL1 and AF4 proteins involved in acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 12160--12164.
- Pui CH, Behm FG, Downing JR, Hancock ML, Shurtleff SA, Ribeiro RC *et al* (1994). 11q23/MLL rearrangement confers a poor prognosis in infants with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* **12**: 909--915.
- Pui CH, Frankel LS, Carroll AJ, Raimondi SC, Shuster JJ, Head DR *et al* (1991). Clinical characteristics and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia with the t(4;11)(q21;q23): a collaborative study of 40 cases. *Blood* **77**: 440--447.
- Rabbitts TH (1999). Perspective: chromosomal translocations can affect genes controlling gene expression and differentiation--why are these functions targeted? *J Pathol* **187**: 39--42.
- Rasio D, Schichman SA, Negrini M, Canaani E, Croce CM (1996). Complete exon structure of the ALL1 gene. *Cancer Res* **56**: 1766--1769.
- Ratain MJ, Kaminer LS, Bitran JD, Larson RA, Beau MML, Skosey C *et al* (1987). Acute nonlymphocytic leukemia following etoposide and cisplatin combination chemotherapy for advanced non-small-cell carcinoma of the lung. *Blood* **70**: 1412--1417.

- Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M *et al* (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **406**: 593--599.
- Reichel M, Gillert E, Angermüller S, Hensel JP, Heidel F, Lode M *et al* (2001). Biased distribution of chromosomal breakpoints involving the MLL gene in infants versus children and adults with t(4;11) ALL. *Oncogene* **20**: 2900--2907.
- Reichel M, Gillert E, Breitenlohner I, Repp R, Greil J, Beck JD *et al* (1999). Rapid isolation of chromosomal breakpoints from patients with t(4;11) acute lymphoblastic leukemia: implications for basic and clinical research. *Cancer Res* **59**: 3357--3362.
- Reichel M, Gillert E, Nilson I, Siegler G, Greil J, Fey GH *et al* (1998). Fine structure of translocation breakpoints in leukemic blasts with chromosomal translocation t(4;11): the DNA damage-repair model of translocation. *Oncogene* **17**: 3035--3044.
- Richardson C, Jasin M (2000). Frequent chromosomal translocations induced by DNA double-strand breaks. *Nature* **405**: 697--700.
- Rodriguez-Perales S, Cano F, Lobato M, Rabbitts T (2008). MLL gene fusions in human leukaemias: in vivo modelling to recapitulate these primary tumourigenic events. *Int J Hematol* **87**: 3--9.
- Rooney S, Chaudhuri J, Alt FW (2004). The role of the non-homologous end-joining pathway in lymphocyte development. *Immunol Rev* **200**: 115--131.
- Ross JA (2000). Dietary flavonoids and the MLL gene: A pathway to infant leukemia? *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 4411--4413.
- Roth DB, Chang XB, Wilson JH (1989). Comparison of filler DNA at immune, nonimmune, and oncogenic rearrangements suggests multiple mechanisms of formation. *Mol Cell Biol* **9**: 3049--3057.
- Roth DB, Porter TN, Wilson JH (1985). Mechanisms of nonhomologous recombination in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **5**: 2599--2607.
- Roth DB, Wilson JH (1986). Nonhomologous recombination in mammalian cells: role for short sequence homologies in the joining reaction. *Mol Cell Biol* **6**: 4295--4304.
- Rowley JD (1973). Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* **243**: 290--293.
- Rowley JD, Diaz MO, Espinosa R, Patel YD, van Melle E, Ziemer S *et al* (1990). Mapping chromosome band 11q23 in human acute leukemia with biotinylated probes: identification of 11q23 translocation breakpoints with a yeast artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 9358--9362.
- Rowley JD, Olney HJ (2002). International workshop on the relationship of prior therapy to balanced chromosome aberrations in therapy-related myelodysplastic syndromes and acute leukemia: overview report. *Genes Chromosomes Cancer* **33**: 331--345.

- Rozenblatt-Rosen O, Rozovskaia T, Burakov D, Sedkov Y, Tillib S, Blechman J *et al* (1998). The C-terminal SET domains of ALL-1 and TRITHORAX interact with the INI1 and SNR1 proteins, components of the SWI/SNF complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 4152--4157.
- Rozovskaia T, Feinstein E, Mor O, Foa R, Blechman J, Nakamura T *et al* (2001). Upregulation of Meis1 and HoxA9 in acute lymphocytic leukemias with the t(4 : 11) abnormality. *Oncogene* **20**: 874--878.
- Ruthenburg AJ, Wang W, Graybosch DM, Li H, Allis CD, Patel DJ *et al* (2006). Histone H3 recognition and presentation by the WDR5 module of the MLL1 complex. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 704--712.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (2001). *"Molecular Cloning: A Laboratory Manual"*. Cold Spring Harbor Press.
- Sánchez-García I, Rabbitts TH (1993). LIM domain proteins in leukaemia and development. *Semin Cancer Biol* **4**: 349--358.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-7.
- Scherer WF, Syverton JT, Gey GO (1953). Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med* **97**: 695-710.
- Schichman SA, Caligiuri MA, Gu Y, Strout MP, Canaani E, Bloomfield CD *et al* (1994). ALL-1 partial duplication in acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 6236-6239.
- Schoch C, Schnittger S, Klaus M, Kern W, Hiddemann W, Haferlach T (2003). AML with 11q23/MLL abnormalities as defined by the WHO classification: incidence, partner chromosomes, FAB subtype, age distribution, and prognostic impact in an unselected series of 1897 cytogenetically analyzed AML cases. *Blood* **102**: 2395--2402.
- Shahbazian MD, Zhang K, Grunstein M (2005). Histone H2B ubiquitylation controls processive methylation but not monomethylation by Dot1 and Set1. *Mol Cell* **19**: 271--277.
- Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BNG, Palmer AE, Tsien RY (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **22**: 1567--1572.
- Shi X, Hong T, Walter KL, Ewalt M, Michishita E, Hung T *et al* (2006). ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature* **442**: 96--99.
- Slany RK, Lavau C, Cleary ML (1998). The oncogenic capacity of HRX-ENL requires the transcriptional transactivation activity of ENL and the DNA binding motifs of HRX. *Mol Cell Biol* **18**: 122--129.
- So CW, Cleary ML (2002). MLL-AFX requires the transcriptional effector domains of AFX to transform myeloid progenitors and transdominantly interfere with forkhead protein function. *Mol Cell Biol* **22**: 6542--6552.

- So CW, Cleary ML (2003). Common mechanism for oncogenic activation of MLL by forkhead family proteins. *Blood* **101**: 633--639.
- So CW, Lin M, Ayton PM, Chen EH, Cleary ML (2003). Dimerization contributes to oncogenic activation of MLL chimeras in acute leukemias. *Cancer Cell* **4**: 99--110.
- Srinivasan RS, Nesbit JB, Marrero L, Erfurth F, LaRussa VF, Hemenway CS (2004). The synthetic peptide PFWT disrupts AF4-AF9 protein complexes and induces apoptosis in t(4;11) leukemia cells. *Leukemia* **18**: 1364--1372.
- Stauber RH, Horie K, Carney P, Hudson EA, Tarasova NI, Gaitanaris GA *et al* (1998). Development and applications of enhanced green fluorescent protein mutants. *Biotechniques* **24**: 462--6, 468-71.
- Strick R, Strissel PL, Borgers S, Smith SL, Rowley JD (2000). Dietary bioflavonoids induce cleavage in the MLL gene and may contribute to infant leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 4790--4795.
- Strissel PL, Strick R, Rowley JD, Zeleznik-Le NJ (1998). An in vivo topoisomerase II cleavage site and a DNase I hypersensitive site colocalize near exon 9 in the MLL breakpoint cluster region. *Blood* **92**: 3793--3803.
- Strout MP, Marcucci G, Bloomfield CD, Caligiuri MA (1998). The partial tandem duplication of ALL1 (MLL) is consistently generated by Alu-mediated homologous recombination in acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 2390--2395.
- Sun Z-W, Allis CD (2002). Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* **418**: 104--108.
- Super HG, Strissel PL, Sobulo OM, Burian D, Reshmi SC, Roe B *et al* (1997). Identification of complex genomic breakpoint junctions in the t(9;11) MLL-AF9 fusion gene in acute leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* **20**: 185--195.
- Super HJG, Rothberg PG, Kobayashi H, Freeman AI, Diaz MO, Rowley JD (1994). Clonal, nonconstitutional rearrangements of the MLL gene in infant twins with acute lymphoblastic leukemia: in utero chromosome rearrangement of 11q23. *Blood* **83**: 641--644.
- Takeda S, Chen DY, Westergard TD, Fisher JK, Rubens JA, Sasagawa S *et al* (2006). Proteolysis of MLL family proteins is essential for taspase1-orchestrated cell cycle progression. *Genes Dev* **20**: 2397--2409.
- Taki T, Kano H, Taniwaki M, Sako M, Yanagisawa M, Hayashi Y (1999). AF5q31, a newly identified AF4-related gene, is fused to MLL in infant acute lymphoblastic leukemia with ins(5;11)(q31;q13q23). *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 14535--14540.
- Terranova R, Agherbi H, Boned A, Meresse S, Djabali M (2006). Histone and DNA methylation defects at Hox genes in mice expressing a SET domain-truncated form of Mll. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 6629--6634.

- Teyssier JR, Bartram CR, Deville J, Potron G, Pigeon F (1985). c-abl Oncogene and chromosome 22 "bcr" juxtaposition in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* **312**: 1393--1394.
- Thirman MJ, Gill HJ, Burnett RC, Mbangkollo D, McCabe NR, Kobayashi H *et al* (1993). Rearrangement of the MLL gene in acute lymphoblastic and acute myeloid leukemias with 11q23 chromosomal translocations. *N Engl J Med* **329**: 909--914.
- Tkachuk DC, Kohler S, Cleary ML (1992). Involvement of a homolog of Drosophila trithorax by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias. *Cell* **71**: 691-700.
- Tschiersch B, Hofmann A, Krauss V, Dorn R, Korge G, Reuter G (1994). The protein encoded by the Drosophila position-effect variegation suppressor gene Su(var)3-9 combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes. *EMBO J* **13**: 3822--3831.
- van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G *et al* (1999). Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* **13**: 1901--1928.
- von Bergh ARM, Beverloo HB, Rombout P, van Wering ER, van Weel MH, Beverstock GC *et al* (2002). LAF4, an AF4-related gene, is fused to MLL in infant acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* **35**: 92--96.
- Werner M. (1999). Universität Erlangen-Nürnberg, Institut für Mikrobiologie, Biochemie und Genetik.
- Wong P, Iwasaki M, Somervaille TCP, So CWE, So CWE, Cleary ML (2007). Meis1 is an essential and rate-limiting regulator of MLL leukemia stem cell potential. *Genes Dev* **21**: 2762--2774.
- Wysocka J, Myers MP, Laherty CD, Eisenman RN, Herr W (2003). Human Sin3 deacetylase and trithorax-related Set1/Ash2 histone H3-K4 methyltransferase are tethered together selectively by the cell-proliferation factor HCF-1. *Genes Dev* **17**: 896--911.
- Wysocka J, Reilly PT, Herr W (2001). Loss of HCF-1-chromatin association precedes temperature-induced growth arrest of tsBN67 cells. *Mol Cell Biol* **21**: 3820--3829.
- Wysocka J, Swigut T, Milne TA, Dou Y, Zhang X, Burlingame AL *et al* (2005). WDR5 associates with histone H3 methylated at K4 and is essential for H3 K4 methylation and vertebrate development. *Cell* **121**: 859--872.
- Wysocka J, Swigut T, Xiao H, Milne TA, Kwon SY, Landry J *et al* (2006). A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature* **442**: 86--90.
- Xia Z-B, Anderson M, Diaz MO, Zeleznik-Le NJ (2003). MLL repression domain interacts with histone deacetylases, the polycomb group proteins HPC2 and BMI-1, and the corepressor C-terminal-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 8342--8347.

- Xia Z-B, Popovic R, Chen J, Theisler C, Stuart T, Santillan DA *et al* (2005). The MLL fusion gene, MLL-AF4, regulates cyclin-dependent kinase inhibitor CDKN1B (p27kip1) expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 14028--14033.
- Yano T, Nakamura T, Blechman J, Sorio C, Dang CV, Geiger B *et al* (1997). Nuclear punctate distribution of ALL-1 is conferred by distinct elements at the N terminus of the protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 7286--7291.
- Yokoyama A, Kitabayashi I, Ayton PM, Cleary ML, Ohki M (2002). Leukemia proto-oncoprotein MLL is proteolytically processed into 2 fragments with opposite transcriptional properties. *Blood* **100**: 3710--3718.
- Yokoyama A, Somervaille TCP, Smith KS, Rozenblatt-Rosen O, Meyerson M, Cleary ML (2005). The menin tumor suppressor protein is an essential oncogenic cofactor for MLL-associated leukemogenesis. *Cell* **123**: 207--218.
- Yokoyama A, Wang Z, Wysocka J, Sanyal M, Aufiero DJ, Kitabayashi I *et al* (2004). Leukemia proto-oncoprotein MLL forms a SET1-like histone methyltransferase complex with menin to regulate Hox gene expression. *Mol Cell Biol* **24**: 5639--5649.
- Yu BD, Hanson RD, Hess JL, Horning SE, Korsmeyer SJ (1998). MLL, a mammalian trithorax-group gene, functions as a transcriptional maintenance factor in morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 10632--10636.
- Yu BD, Hess JL, Horning SE, Brown GA, Korsmeyer SJ (1995). Altered Hox expression and segmental identity in Mll-mutant mice. *Nature* **378**: 505--508.
- Zeisig BB, Milne T, García-Cuellar M-P, Schreiner S, Martin M-E, Fuchs U *et al* (2004). Hoxa9 and Meis1 are key targets for MLL-ENL-mediated cellular immortalization. *Mol Cell Biol* **24**: 617--628.
- Zeisig DT, Bittner CB, Zeisig BB, García-Cuellar M-P, Hess JL, Slany RK (2005). The eleven-nineteen-leukemia protein ENL connects nuclear MLL fusion partners with chromatin. *Oncogene* **24**: 5525--5532.
- Zelevnik-Le NJ, Harden AM, Rowley JD (1994). 11q23 translocations split the "AT-hook" cruciform DNA-binding region and the transcriptional repression domain from the activation domain of the mixed-lineage leukemia (MLL) gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 10610--10614.
- Zhang Y, Strissel P, Strick R, Chen J, Nucifora G, Beau MML *et al* (2002). Genomic DNA breakpoints in AML1/RUNX1 and ETO cluster with topoisomerase II DNA cleavage and DNase I hypersensitive sites in t(8;21) leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 3070--3075.
- Zhang Y, Zelevnik-Le N, Emmanuel N, Jayathilaka N, Chen J, Strissel P *et al* (2004). Characterization of genomic breakpoints in MLL and CBP in leukemia patients with t(11;16). *Genes Chromosomes Cancer* **41**: 257--265.
- Zhu B, Zheng Y, Pham A-D, Mandal SS, Erdjument-Bromage H, Tempst P *et al* (2005). Monoubiquitination of human histone H2B: the factors involved and their roles in HOX gene regulation. *Mol Cell* **20**: 601--611.

8 ANHANG

8.1 Lebenslauf

Name: Clarissa Cristina Maria Oehm

Geburtsdatum: 11.04.1979

Geburtsort: Koblenz

1985 – 1989 Grundschule Neu-Karthause, Koblenz

1989 – 1998 Gymnasium auf der Karthause, Koblenz

Abschluss: Abitur

10/1998 – 9/2000 Grundstudium der Biologie an der
Justus-Liebig-Universität, Gießen

Zwischenprüfung: Vordiplom

10/2000 – 7/2003 Hauptstudium der Biologie an der
Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg

Hauptfach: Molekularbiologie; Nebenfächer: Zellbiologie, Zoologie

Diplomarbeitsthema: „Generierung von Hefe-Expressionsvektoren
sowie rekombinanten Adenoviren zur Expression der DHBV
Oberflächenproteine und einer Mutante des DHBV-L Proteins“

Abschluss: Diplom-Biologin

10/2003-12/2003 Auslandsaufenthalt in England und den USA

5/2004 – 8/2004 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Pharmazeutische
Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am
Main

9/2004 – 2/2009 Promotion am Institut für Pharmazeutische Biologie der Johann
Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main mit dem Thema:

„Intramolekulares Interaktionsinterface des MLL Proteins als thera-
peutisches Target der Translokation t(4;11)“

Akademische Lehrer: PD Dr. Stephan Urban, Dr. Michael Lanzer

Prof. Dr. Rolf Marschalek, Prof. Dr. Theo Dingermann

8.2 Publikationen und Vorträge

Genomic DNA of leukemic patients: target for clinical diagnosis of MLL rearrangements

Claus Meyer, Eric Kowarz, Björn Schneider, Clarissa Oehm, Thomas Klingebiel, Theo Dingermann und Rolf Marschalek
Biotechnology Journal 2006.1: 656--663.

Intramolecular Interactions of the human MLL Protein

Vortrag im Rahmen des Doktorandenseminars der pharmazeutischen Institute der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main. Oktober 2006

8.3 Danksagung

Mein besonderer Dank geht an:

Prof. Dr. Rolf Marschalek für die Aufnahme in seinem Arbeitskreis und die Überlassung des interessanten Themas und für die Unterstützung auch in schwierigen Situationen.

Prof. Dr. Theo Dingermann für die Diskussionsbeiträge während des Arbeitsseminars und die gute Zusammenarbeit im Bioll Praktikum. Zusätzlich bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Shirley Knauer für die Überlassung der Plasmide für das PTB-System und für die freundliche Einarbeitung in die Methodik.

Meine früheren Bench-Nachbarn, Dr. Sven Moritz, Dr. Sebastian Scharf und Dr. Jürgen Zech, die mir den Einstieg in die Doktorarbeit so leicht gemacht haben.

Alle jetzigen und früheren Mitarbeiter des Labors: Sabrina Baltruschat, Anne Benedikt, Silvia Bracharz, Dr. Thanh Chung, Irina Eberle, Annika Heil, Julia Hofmann, Miriam Jacobi, Dr. Ingo Jennes, Dr. Eric Kowarz, Erika Lemmer, Dr. Claus Meyer, Mirko Moreno, Freia Pfeil, Birgit Pless, Jens Rabenstein, Samaneh Sabiani, Dr. Björn Schneider, Dr. Oliver Siol, Nadine Spilger, Ute Steiner, Hagen Witzel und Dr. Ilse Zündorf. Danke für die gute Zusammenarbeit, ob im Labor oder im Kaffeeraum!

Ein besonders besonderes „Danke Schön“ an:

Dr. Adelheid Bursen, Karen Schwabe und Jenny Merkens. Es ist schön, außer einem Dokortitel auch noch echte Freundschaft mitzunehmen;))!

Meine ganze Familie, durch die ich das bin, was ich bin! Danke für alle Unterstützung in allen Lebenslagen!

Pütti Simon, ohne die ich nie an diesen Punkt gekommen wäre (Der Weg ist das Ziel!).

Marc Hammerton, dafür dass er nie aufgehört hat mich zu unterstützen. Danke für die Geduld und die Motivation, die mich hat durchhalten lassen! Danke für ALLES!!